

**Biophysikalische Untersuchungsmethoden für die Entwicklung
nichtviraler Gentherapeutika**

***Kondensation von Nukleinsäuren und Transfektion von Leber-
zellen mit nichtviralen Trägersystemen***

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

**Christian Welz
aus Menden (Sauerland)**

Marburg/Lahn 2000

Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 09. Februar 2000 angenommen.
Erstgutachter: Prof. Dr. A. Fahr, Marburg
Zweitgutachter: Prof. Dr. G. Fricker, Heidelberg
Tag der mündlichen Prüfung am 09. Februar 2000

Danksagung

Diese Arbeit ist unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Fahr entstanden. Ich danke dafür, dass ich die Arbeiten in seinem Labor unter seiner Anleitung durchführen konnte und die Möglichkeit hatte, die Ergebnisse auf zahlreichen nationalen und internationalen Kongressen vorführen zu können, wo ich zahlreiche weitere Anregungen für die Durchführung dieser Arbeiten erhalten habe.

Viele Reisen haben mich durch Deutschland geführt, um Techniken zur Molekularbiologie zu lernen oder Experimente durchzuführen, die für den Erfolg der Arbeit notwendig waren. Für die Möglichkeiten, einen Einblick in die Arbeiten zu erhalten und viele wertvolle Tipps, die ich zur Umsetzung meiner Ideen in dieser Arbeit mit einbringen konnte, möchte ich danken:

- D. Groth und R. Reszka (MDC, Berlin-Buch) für die Möglichkeit zum Präparieren von Plasmid-DNA und erste Einweisung in die Grundprinzipien zur Gentherapie,
- H. Ruf (MPI, Frankfurt) für wertvolle Tipps und Messungen mit der Photonenkorrelationsspektroskopie,
- G. Nelles (Uni Mainz, jetzt Sony Deutschland) und H.J. Butt (Uni Mainz) für die großartige Unterstützung bei der Rasterkraftmikroskopie,
- S. Heck (Institut für Virologie, Uni Marburg) für die unermüdliche Hilfe bei der Durchführung der Transmissionselektronenmikroskopie,
- N. Gratzki, S. Rühl, M. Metzler, R. Repp und W. Rascher und last but not least U. Jacobs für die Möglichkeit, in Erlangen Zellkulturversuche durchführen zu können sowie für das Zurverfügungstellen der Zellen und Materialien (insb. Hybridoligonukleotide),
- W. Neuhuber (Institut für Anatomie, Erlangen) für die technische Unterstützung und wertvolle Diskussionen bei der konfokalen Mikroskopie,
- H. Schreier (Bernina Biosystems, Martinsried) für liposomale Formulierungen, weitere Chemikalien und viele hilfreiche Diskussionen.

Weiterhin danke ich allen, die mich bei der Durchführung der Arbeiten im Labor unterstützt haben, sowohl im eigenen Arbeitskreis, als auch den Doktoranden und technischen Angestellten im Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, sowie zahlreichen Hilfen aus dem Fachbereich Pharmazie.

Letztendlich gilt mein allergrößter Dank meiner Frau Ursula und meinem Sohn David, die die zahlreiche Wochen, Abende und Wochenenden auf mich wartend zu Hause verbracht haben und mir stets die notwendige Zuwendung und Unterstützung haben zukommen lassen.

Für das Korrekturlesen danke ich insbesondere Sabine Bucké und nochmals meiner Frau Ursula, ohne deren Unterstützung dieses Manuskript in dieser Form nicht hätte fertig gestellt werden können.

Inhaltsverzeichnis

<u>DANKSAGUNG.....</u>	<u>3</u>
-------------------------------	-----------------

<u>INHALTSVERZEICHNIS.....</u>	<u>4</u>
---------------------------------------	-----------------

<u>EINLEITUNG</u>	<u>8</u>
--------------------------------	-----------------

1 GENTHERAPIE: VON DER KLINIK ZUR BIOPHYSIK THERAPEUTISCHER NUKLEINSÄUREN	8
1.1 Möglichkeiten des therapeutischen Einsatzes von Gentherapeutika	11
1.2 Genetisches Material für den Gentransfer	18
1.2.1 Nukleinsäuren als Arzneistoffe	18
1.2.2 Genetische Defekte	18
1.2.3 Blockade der Genexpression.....	19
1.2.4 Genkonversion von Punktmutationen durch homologe Rekombination.....	20
1.2.5 Gensubstitution mit Plasmiden	25
1.3 Methoden des zellulären Transfers von genetischem Material.....	27
1.3.1 Mechanische Methoden	29
1.3.2 Physikalische Methoden	29
1.3.3 Virale Trägersysteme	29
1.3.4 Chemische Trägersysteme	30
1.3.5 Kombinationen von Transfektionsmethoden.....	36
1.4 Mechanismen des Transports und der Freisetzung in der Zelle	37
1.5 Kondensation von Nukleinsäuren	38
1.6 Modelle von Komplexen.....	40
1.7 Ziel der Arbeit	42

MATERIALIEN UND METHODEN	44
2 MATERIALIEN	44
2.1 Nukleinsäuren	44
2.1.1 Plasmid-DNA.....	47
2.1.2 Oligonukleotide.....	47
2.2 DNA-Farbstoffe	49
2.3 Lipide und Liposomen.....	50
2.4 Kationische Proteine und Polymere	50
2.5 Bakterienkulturen, Zellkulturmedien und –substrate.....	53
2.5.1 Bakterienkulturmedium	53
2.5.2 Zellkulturmedien.....	54
2.5.3 Pufferlösungen und weitere Chemikalien.....	54
2.5.4 Anti-fading mounting medium	55
3 METHODEN	56
3.1 DNA-Methoden	56
3.1.1 Darstellung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> durch säulenchromatographische Aufreinigung	56
3.1.2 Gehaltsbestimmung von DNA.....	58
3.2 Liposomen.....	59
3.3 Größencharakterisierung kolloider Systeme durch Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ..	60
3.4 Fluoreszenzspektroskopische Methoden	60
3.4.1 Spektren von Thymus-DNA mit interkalierenden Farbstoffen	61
3.4.2 Messung der DNA-Kondensationskinetik	61
3.4.3 Messung der DNA-Kondensation durch inkrementelle Kondensationsmessung.....	65
3.5 Mikroskopische Methoden.....	70
3.5.1 Transmissionselektronenmikroskopie	70
3.5.2 Rasterkraftmikroskopie	70
3.5.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	71
3.6 Zellkultur	72
3.6.1 Zellkultur	72
3.6.2 Transfektion mit fdNA:DNA-Oligonukleotiden und nichtkationischen liposomalen Formulierungen für CLSM-Untersuchungen.....	72
3.6.3 Messung der Zellproliferation mit BrdU-Assay	73

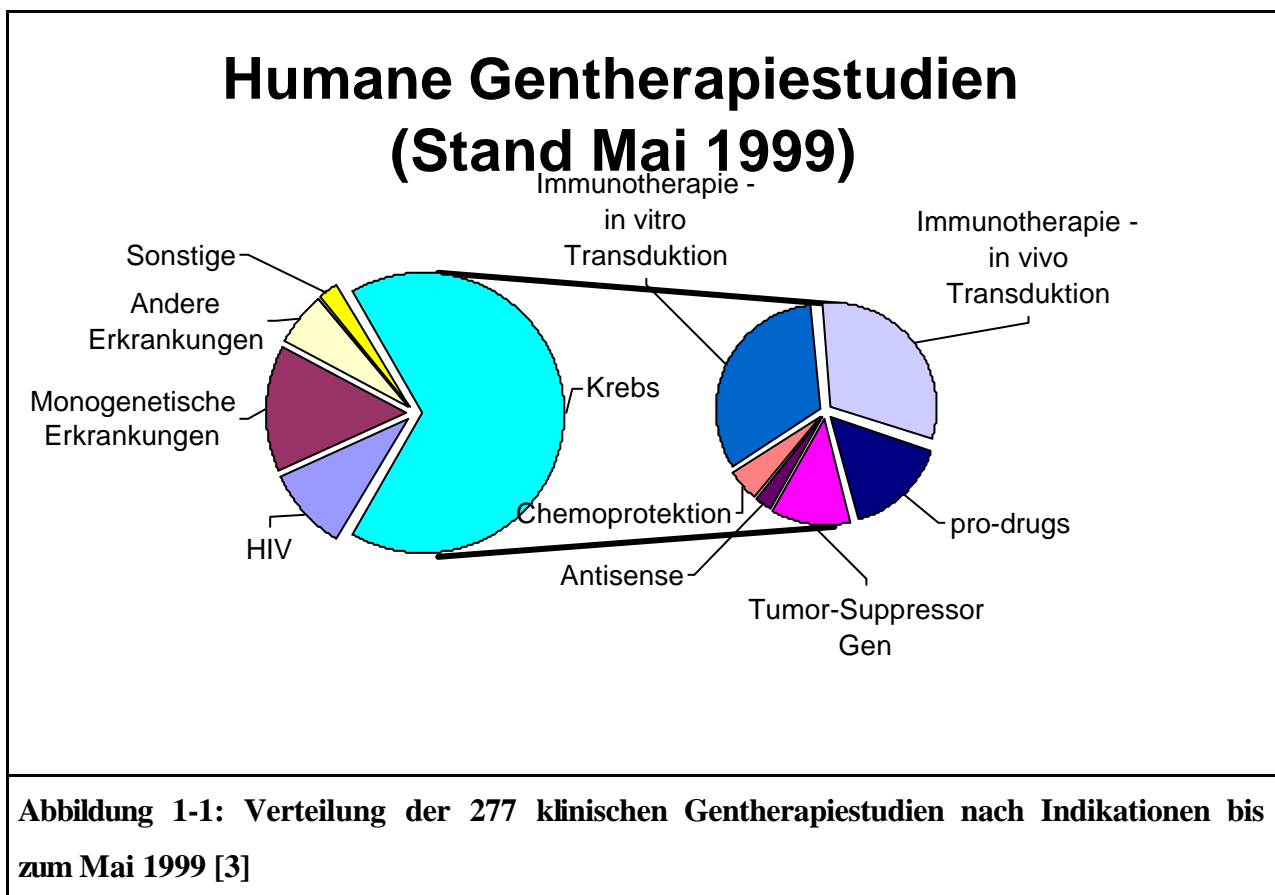
3.7	Konzentrations- und Zeitangaben.....	74
ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....		76
DNA-METHODEN		76
4	PRÄPARIEREN VON PLASMID-DNA.....	76
5	GEHALTSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	78
5.1	Photometrische Gehaltsbestimmung.....	78
5.1.1	Standard-Nukleinsäuren.....	79
5.1.2	Kommerziell erhältliche Nukleinsäuren	80
5.2	Fluoreszenzspektroskopische Gehaltsbestimmung.....	81
LIPOSOMEN.....		84
6	HERSTELLEN UND CHARAKTERISIEREN VON LIPOSOMEN	84
6.1	Quellung von Liposomen.....	84
6.2	Untersuchungen zur Größe und Stabilität liposomaler Formulierungen für die Gentherapie ..	86
FLUORESCENZSPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR KONDENSATION VON NUKLEINSÄUREN		91
7	STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN VON KOMPLEXIERTER DNA (KINETIKASSAY)	92
7.1	Spektren von DNA-Farbstoff-Komplexen.....	92
7.2	Ausbleichen von DNA-Farbstoff-Komplexen.....	93
7.3	Fluorimetrische Messung der DNA-Kondensation I: Fluoreszenzfarbstoffe	102
7.4	Fluorimetrische Messung der DNA-Kondensation II: Charakterisierung von Genträgersystemen mit PicoGreen™-markierter Plasmid-DNA.....	116
8	INKREMENTELLE NUKLEINSÄUREKONDENSATION: HOCHLEISTUNGSMETHODE ZUR ZEITUNABHÄNGIGEN KONDENSATIONSMESSUNG.....	132
8.1	Ausbleichen von fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuren.....	133
8.2	Farbstoffe	134
8.3	Variablen der Nukleinsäurekondensation.....	135
8.4	Puffer.....	136
8.5	Kooperativität: Vergleich der Kondensation von Plasmid-DNA mit Protaminsulfat und PEI	143
8.6	Qualitätskontrolle durch Kondensationsmessung.....	144
MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGSVERFAHREN FÜR LIPOSOMEN UND KOMPLEXIERTE NUKLEINSÄUREN		150

9	ABBILDENDE RASTERKRAFTMIKROSKOPIE* UND TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE# VON KATIONISCHEN LIPIDEN UND KOMPLEXIERTER NUKLEINSÄURE.....	150
9.1	Messungen an Luft.....	156
9.1.1	Plasmid-DNA.....	156
9.1.2	Protaminsulfat-Plasmid-Komplexe	157
9.1.3	Lipid-DNA-Komplexe	159
9.1.4	AVE™ & protaminkondensierte DNA.....	166
9.2	Darstellung von kationischen Liposomen und Lipoplexen in der Lösungsmittelzelle	171
10	KONFOKALE LASERSCANNING MIKROSKOPIE.....	177
10.1	Nuclear transport of oligonucleotides in HepG2-cells mediated by protamine sulfate and negatively charged liposomes	177
	ZELLKULTURVERSUCHE	188
11	OPTIMIEREN VON TRANSFEKTIONSSYSTEMEN	188
11.1	Isolierung genomischer DNA nach Transfektion von HepG2-Zellen mit RNA:DNA-Hybridoligonukleotiden.....	188
11.2	Zellproliferation.....	191
12	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	197
	<u>VERZEICHNISSE.....</u>	<u>188</u>
13	LITERATURVERZEICHNIS.....	208
14	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	220
	<u>LEBENS LAUF.....</u>	<u>222</u>
	<u>ABSTRACTS, POSTER UND PUBLIKATIONEN</u>	<u>223</u>

Einleitung

1 Gentherapie: Von der Klinik zur Biophysik therapeutischer Nukleinsäuren

Ziel gentherapeutischer Therapiestrategien ist es, genetisches Material in bestimmte Zielzellen zu schleusen, um dort genetische Defekte zu korrigieren oder Zellregulationsmechanismen durch Eingriff in die Transkription oder Translation zu manipulieren. Ist dieses Ziel erreicht, steht für viele durch genetische Defekte verursachte Krankheiten, für die es heute keine oder nur unbefriedigende Behandlungsmöglichkeiten gibt, eine Kausaltherapie durch Substitution des defekten Gens oder Genabschnitts zur Verfügung. Desweiteren werden große Erwartungen in die Genthera-



pie zur Entwicklung neuer Therapieprinzipien für die Krebsbehandlung und Entwicklung von Genpharmaka gegen virale Erkrankungen gesetzt. Bis zum Mai 1999 wurden vom Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) des NIH 284 USA-nationale und 36 internationale klinische Protokolle mit humanen Genmarkern oder als Therapieprotokolle aufgeführt. 36 Genmarkerstudien stehen 277 therapeutische klinische Studien gegenüber (Abbildung 1-2). 70 % der klinischen Studien zielen auf die Therapie von Krebsleiden. Weitere Schwerpunkte klinischer Gentherapiestudien sind HIV-Erkrankungen und die monogenetische Erkrankung zystische Fibrose mit 18 registrierten klinischen Therapiestudien (Abbildung 1-1).

In Deutschland sind bis zu dem genannten Zeitpunkt eine klinische Gentherapiestudie zur intratumoralen Injektion eines kationisch lipidformulierten (DOTMA/Chol) Plasmids, welches das Gen für die Expression von IL-2 kodiert [1] sowie eine Studie zum plasmidvermittelten Transfer des Interleukin-7-Gens [2] registriert.

	Review Level 1	Review Level 2	Review Level 3	Review Level 4	Review Level 5	Review Level 6	Review Level 7	TOTAL
Marking	23	2	5	0	2	2	0	34
Therapy	83	5	92	1	10	76	10	277
Non-Therapeutic	1	0	0	0	0	0	1	2
Infectious Diseases	8	1	11	1	0	6	0	27
1. Human Immunodeficiency Virus	8	1	11	1	0	6	0	27
Monogenic Diseases	20	1	9	0	2	5	3	40
1. Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Virus	1	0	0	0	0	0	0	1
2. Chronic Granulomatous Disease	1	0	1	0	0	1	0	3
3. Cystic Fibrosis	10	1	5	0	0	2	0	18
4. Familial Hypercholesterolemia	1	0	0	0	0	0	0	1
5. Fanconi Anemia	1	0	0	0	0	1	0	2
6. Gaucher Disease	3	0	0	0	0	0	0	3
7. Hunter Syndrome	1	0	0	0	0	0	0	1
8. Ornithine Transcarbamylase Deficiency	0	0	1	0	0	0	0	1
9. Purine Nucleoside Phosphorylase Deficiency	1	0	0	0	0	0	0	1
10. SCID-ADA	1	0	0	0	0	0	0	1
11. X-linked SCID	0	0	1	0	0	0	0	1
12. Leukocyte Adherence Deficiency	0	0	1	0	0	0	0	1
13. Canavan Disease	0	0	0	0	0	1	1	2
14. Hemophilia	0	0	0	0	1	0	2	3
15. Gynae Atrophy	0	0	0	0	1	0	0	1
Other Diseases/Disorders	2	0	2	0	1	8	4	17
1. Peripheral Artery Disease	1	0	0	0	0	7	0	8
2. Rheumatoid Arthritis	1	0	0	0	0	0	1	2
3. Arterial Restenosis	0	0	1	0	0	0	0	1
4. Cubital Tunnel Syndrome	0	0	1	0	0	0	0	1
5. Coronary Artery Disease	0	0	0	0	1	1	3	5
Cancer (By Therapeutic Approach)	53	3	70	0	7	57	3	193
1. Antisense	4	0	0	0	0	1	0	5
2. Chemoprotection	4	0	4	0	0	1	0	9
3. Immunotherapy/In Vitro Transduction	22	2	19	0	0	17	0	60
4. Immunotherapy/In Vivo Transduction	7	0	28	0	4	19	1	59
5. Pro-drug/HSV-TK and Ganciclovir	12	1	10	0	1	6	0	30
6. Tumor Suppressor Gene	3	0	6	0	2	12	0	23
7. Single Chain Antibody	0	0	2	0	0	0	0	2
8. Oncogene Down-Regulation	1	0	1	0	0	1	0	3
9. Vector-Directed Cell Lysis	0	0	0	0	0	0	2	2
Total Gene Transfer Protocols (Therapy, Marking and Non-Therapeutic)	107	7	97	1	12	78	11	313

Review Level 1 = Full RAC review + NIH Director approval + FDA Investigational New Drug (IND) approval. This review process is no longer in effect.

Review Level 2 = Accelerated RAC Review + NIH Office of Recombinant DNA Activities (ORDA) Approval + FDA IND Approval. This review process is no longer in effect.

Review Level 3 = Sole FDA Review Recommended by NIH/ORDA. Simultaneous submission to NIH(ORDA) required for the purpose of data monitoring and adverse event reporting. This review process is no longer in effect.

Review Level 4 = Sole FDA Review [submission to NIH(ORDA) not required]. This is only for non-NIH funded (either direct or collaborative) institutions who elect to submit to NIH(ORDA) under voluntary compliance.

Review Level 5 = Received by NIH(ORDA). Review level pending.

Review Level 6 = Sole FDA Review Recommended by NIH/ORDA. Submission to NIH(ORDA) required for the purpose of data monitoring and adverse event reporting. This review process is currently in effect.

Review Level 7 = Full RAC discussion + FDA approval. This review process is currently in effect.

Abbildung 1-2: Überblick über humane Gentherapiestudien (Stand 15.08.99) [3].

1.1 Möglichkeiten des therapeutischen Einsatzes von Gentherapeutika

Die **Keimbahntherapie** zielt auf eine dauerhafte genetische Modifizierung der Ei- bzw. Spermienzellen von genetisch nicht-gesunden Eltern, um genetische Defekte, die Krankheiten auslösen oder zu einer Prädisposition für bestimmte Krankheiten (Tumoren) führen können, zu kurieren. Die Keimbahntherapie ist ethisch umstritten und es ist noch nicht endgültig geklärt, ob es das Ziel von Therapiestrategien sein darf, die Keimbahn zu modifizieren [3, 4].

Die Entwicklung der Gentherapeutika zielt daher meistens auf die somatischen Zellen. Die **somatische Gentherapie** kann *in vivo* –d.h. durch genetische Modifizierung der erkrankten Zellen im Körper durch z.B. parenterale oder pulmonale Applikation– als auch *ex vivo* erfolgen. Bei der *ex vivo*-Therapie werden genetisch defekte Zellen dem Körper entnommen, außerhalb des Körpers transfiziert und genetisch modifiziert, anschließend in den Körper zurückinfundiert.

Die Expression des transferierten Gens kann transient oder dauerhaft sein. Eine **transiente Expression** ist bei Tumorerkrankungen erwünscht. Nach Eradikation des Tumors wird das fremde Gen nicht mehr benötigt und sollte aus den transfizierten Nichttumorzellen entfernt werden. Bei angeborenen Gendefekten ist hingegen eine **dauerhafte Expression** des transferierten Gens erwünscht.

Die Therapie der **hämatopoetischen Stammzellen**, die teilungsaktiv sind und in verschiedene Zelltypen ausdifferenzieren, wird intensiv erforscht. Die Therapie der hämatopoetischen Stammzellen stellt einen Kompromiß zwischen somatische Gentherapie und Keimbahntherapie dar, da die genetisch modifizierten Zellen sich noch in einem undifferenzierten Zustand befinden und sich erst nach der genetischen Modifizierung zu funktionell differenzierten Zellen weiterentwickeln [5]. Durch Einbau des MDR-1-Gens können transfiziert hämatopoetische Stammzellen von den nichtransfizierten Stammzellen selektioniert werden [6].

Ethisch ebenfalls umstritten -wie die Keimbahntherapie- ist die Therapie eines Embryos oder Fetus *in utero* [7], bei der beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke leichter als beim erwachsenen Menschen überwunden werden kann und somit genetisch bedingte Störungen des Zentralnervensystems pränatal einfacher behandelbar sein könnten.

Gensubstitution

Zahlreiche Erkrankungen werden direkt durch den Defekt eines größeren Genabschnitts verursacht. Die Substitution von defekten Genen stellt sicherlich die größte Herausforderung bei der Entwicklung von Gentherapeutika dar, weil in der Regel große Fragmente der hochpolaren, negativ geladenen und hochmolekularen Nukleinsäure in den Körper oder in die Zielzellen eingebracht werden müssen.

Die häufigste Erkrankung in der kaukasischen Bevölkerungsgruppe stellt die **zystische Fibrose (Mukoviszidose)** mit einer Insidenz von 1:2500 dar [8]. Die zystische Fibrose wird zu 70 % durch die Deletion eines Basentriplets ($\Delta F508$) verursacht. Insgesamt sind über 400 verschiedene Mutationen bekannt [9]. Durch symptomatische Behandlung und insbesondere durch eine erfolgreiche antibiotische Infektionsprophylaxe konnte die Lebenserwartung von CF-Patienten von 1969 bis 1990 von 14 auf 28 Jahre erhöht werden. Ein heute neugeborener CF-Patient hat ohne Verbesserung der Therapie eine Lebenserwartung von 40 Jahren [10]. Eine wesentliche Verbesserung der Lebensqualität ist aber durch die symptomatische Therapie nicht möglich. Hier bietet die Gentherapie die Möglichkeit einer Kausaltherapie, die nicht nur für den Patienten eine Erhöhung von Lebenserwartung und -qualität bedeutet, sondern auch durch Vermeidung von jahrzehntelangen Therapiemaßnahmen zu erheblichen finanziellen Einsparungen führen kann. Allerdings ist die lokale Applikation schwierig, da die DNA den hochviskosen Mucus durchdringen muß, um zu den Zielzellen gelangen zu können [11, 12]. Die lokale pulmonale Applikation erfolgt durch Inhalieren der mittels Verneblern auf eine lungengängige Tröpfchengröße von 1 -5 μm dispergierten komplexierten Nukleinsäuren. Plasmid/DMRIE-DOPE-Komplexe sind beim Vernebeln in Jet-Verneblern nicht stabil [13]. Viele tierexperimentelle Studien, die die Expression von Modellgenen zeigen, wurden mit gesunden Mäusen und Ratten durchgeführt. Mit diesen Studien konnte die Möglichkeit des zielgerichteten Transports in die Lungenepithelien gezeigt werden [14-19]. Ein Schluß auf die pathophysiologischen Verhältnisse bei zystischer Fibrose mit einer hochviskosen Schleimschicht auf den Zielzellen ist nur mit "knock-out-Mäusen", die den CF-Gendefekt und die pathophysiologische Mucusbarriere aufweisen [20], möglich. Eine klinische Studie zeigt die Sicherheit von CF-Gentransfer nach nasaler Instillation in CF-Patienten, wobei aber im Nasenepithel keine signifikante Verbesserung des Ionenflusses erreicht werden konnte [21].

Der Defekt des Enzyms **Adenosindeaminase (ADA)** führt zum Krankheitsbild des "Severe Combined Immune Deficiency" (SCID)-Syndrom. Durch *ex-vivo*-Gentherapie werden Blutlymphozyten oder Knochenmarkstammzellen nach Entnahme der Zellen transfiziert und in den Körper

reinfundiert. Die Studien zeigen den Erfolg des *ex-vivo*-Gentransfers und die biologische Aktivität des Proteins nach Reinfusion der Zellen in den Blutkreislauf [10, 22, 23].

Weitere Erkrankungen, die einem gentherapeutischen Behandlungsansatz zugänglich sein können, sind beispielsweise

- **Gauchers disease**, eine genetisch bedingte Fehlfunktion der Glucocerebrosidase, die zu Fehlsteuerungen im Kohlenhydratstoffwechsel führt,
- die **Sichelzellanämie**, die mit einer Inzidenz von 1:500 auftritt, wird durch eine Punktmutation verursacht. Sie ist der häufigste genetische Defekt in der schwarzen Bevölkerung, bei der sichelförmige Erythrozyten auftreten, die weniger flexibel sind und so nur schwer das Kapillarbett durchdringen können,
- **Hämophilie-Erkrankungen** (Faktor VIII und Faktor IX),
- bei der **familiären Hypercholesterinämie** wird der Rezeptor für low-density lipoproteins (LDL) nicht exprimiert, so dass es vermehrt zur cholesterolhaltigen Plaquebildung kommt. Leberzellen sollen mit dem LDL-Gen transfiziert werden. Nach Expressieren des Gens wird LDL in den Leberzellen verstoffwechselt. Nach partieller Hepatektomie wurde das Gen in die Zellen eingeschleust und die Zellen sind über die Portalvene in die Leber retransplantiert worden. Ein Nachweis der Rezeptoren ist auf einigen Leberzellen ebenso möglich gewesen wie ein Effekt auf den Cholesterolstoffwechsel [24, 25].

Tumorthherapie

Eine zweite grosse Gruppe von Erkrankungen, die mit gentherapeutischen Ansätzen behandelt werden sollen, sind **Tumorerkrankungen**. Dabei werden verschiedene Therapiestrategien verfolgt, bei denen primär nicht der Ersatz von defekten Genen im Vordergrund steht. Die verfolgten Therapiestrategien [26] sind

- Stimulieren des Immunsystems gegen Krebsantigene,
- Erhöhung der Empfindlichkeit von Krebszellen gegen zytostatische Arzneistoffe, z. B. wird durch Einschleusen des Thymidinkinasegens des Herpes-Virus in Tumorzellen gleichzeitig appliziertes Ganciclovir spezifisch in Tumorzellen bioaktiviert. Durch den „bystander-Effekt“ werden auch nichttransfizierte benachbarte Tumorzellen abgetötet [27], so dass eine komplette Tumoreradikation möglich erscheint.
- Wiederherstellung der Funktion von Tumorsuppressorgenen (*Rb*, *p53*, *FHIT*), wobei *p53* eine besondere Rolle bei der Tumorentstehung zu spielen scheint. Bei der Hälfte der Tumoren kommt es zu einer Mutation in diesem Gen,

- Blockade von Oncogenen (s. 1.2.3). *Ras* –eine GTPase- ist ein molekularer Schalter, der die Entscheidung einer Zelle zum Wachstum oder zur Differenzierung reguliert,
- Schutz der normalen Zellen gegen eine Schädigung durch Chemotherapeutika,
- Modifizierung der Immunabwehr durch Cytokingentherapie als Substitutionstherapie.

Virale Erkrankungen

Eine dritte Gruppe von Erkrankungen, die durch Gentherapeutika behandelt werden könnten, sind **virale Erkrankungen**. Auf das Prinzip der Antisense-Strategie wird später genauer eingegangen (s. 1.2.3). Therapeutika gegen viele virale Erkrankungen finden sich bereits in klinischer Prüfung, v.a. gegen HIV, HBV u.a..

Gentherapie gegen **HIV** basiert auf zwei Strategien. Zum einen wird in CD-8-Zellen das Gen für *IL-2* eingebaut, zum anderen wird versucht, über eine Aktivierung des Immunsystems die infizierten Zellen zu zerstören. Durch *Antisenseoligonukleotide* soll die intrazelluläre Synthese von viralen Proteinen unterbunden werden. *Ribozyme* können für das Virus vitale Strukturelemente zerstören. *DNA-Impfstoffe* gegen das Gen des Hüllproteins (*env*) oder der reversen Transkriptase (*rev*) können Immunität gegen das Virus induzieren und wird bereits in klinischen Studien untersucht.

Weitere Viren sind **CMV**, **HBV** und **HSV**, die mit gentherapeutischen Strategien bekämpft werden sollen.

Neurologische Erkrankungen

Die **Parkinson-Krankheit** und **Alzheimer-Erkrankungen** sind Erkrankungen des Zentralnervensystems durch Degeneration von Nerven, so dass für eine Gentherapie die Blut-Hirn-Schranke überwunden werden muß. Die Tyrosin-Hydroxylase soll bei der Parkinsontherapie im ZNS das nichthirngängige Dopamin biosynthetisieren. Bei der Alzheimer Erkrankung kann durch die Insertion von Wachstumshormogenen der Zelluntergang verlangsamt werden.

Kardiovaskuläre Erkrankungen

Die Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind –vor den Tumorerkrankungen- immer noch die häufigste Todesursache in der westlichen Welt. Der Herzmuskel ist hier ein wichtiges Zielgewebe. Vorteilhaft ist, dass in Muskelzellen Plasmide auch nach direkter Injektion exprimiert werden (s. 1.3.2)

Gendefekte der Leber

Die Leber ist ein attraktives Ziel für die Entwicklung von Gentherapeutika:

- Kolloidale Systeme werden nach intravasaler Applikation durch phagozytoseaktive Zellen des RES aufgenommen. Für Lecithin/Cholesterol-Liposomen ist beschrieben, dass kleine Liposomen (SUV) in die Hepatozyten gelangen, während Liposomen mit einem großen Durchmesser (MLV) größtenteils durch Kupffer-Zellen aufgenommen und abgebaut werden. Die SUV können die fenestrierten Wände der Lebersinusoiden durchdringen und zu den Hepatozyten gelangen [28] (Abbildung 1-3). Zur Gentherapie von Lebererkrankungen muß ein Trägersystem geschaffen werden, welches Affinität zu den Hepatozyten der Leber hat und nicht in den RES-Zellen (v.a. Kupffer-Zellen und RES-Zellen der Milz) abgebaut werden.
- Leberzellen besitzen spezifische Oberflächenrezeptoren, die ein Targeting des Genträgersystems zu den Hepatozyten ermöglichen, z. B. den Asialoglykoproteinrezeptor [29]
- Die Leber als zentrale Stoffwechselzentrale ist auch Syntheseort für zahlreiche Enzyme, so dass sich Gendefekte häufig in einem Mangel an Leberenzymen bemerkbar machen.
 - Zahlreiche lysosomale Speicherkrankheiten werden durch genetische Defekte verursacht. Da die Leber das zentrale Stoffwechselorgan des Körpers ist, manifestieren sich zahlreiche dieser Speicherkrankheiten in der Leber, begleitet von einer Volumenzunahme der Leberzellen und folglich auch der gesamten Leber durch akkumulierte Stoffwechselprodukte in den Hepatozyten [30].
 - Die **Tyrosinose** ist eine Stoffwechselstörung, bei der der Abbau des Tyrosins gestört ist. Es werden 3 Typen unterschieden. Der **Typ I** ist eine autosomal-rezessive Störung der **Fumarylacetoacetase (FAH)**. In der akuten Form kommt es zu Leberversagen und tubulären Nierenschädigungen, so dass die Erkrankten lediglich ein Alter von wenigen Wochen erreichen. Bei der chronischen Form treten Leberzirrhose, evtl. Hepatome, Aszites, Hämorrhagien oder Rachitis auf. Die bisherige Therapie ist nur symptomatisch möglich durch phenylalanin- und tyrosinarme Diät und NTBC, einem Hemmer der 4-Hydroxyphenylpyruvatoxidase, evtl. sogar eine Lebertransplantation (s. Abbildung 1-4).

Ein Synonym für den **Typ II** ist "**Richner-Hanhart-Syndrom**". Der **Typ III** charakterisiert einen 4-Hydroxyphenylpyruvatoxidase-Mangel [31].

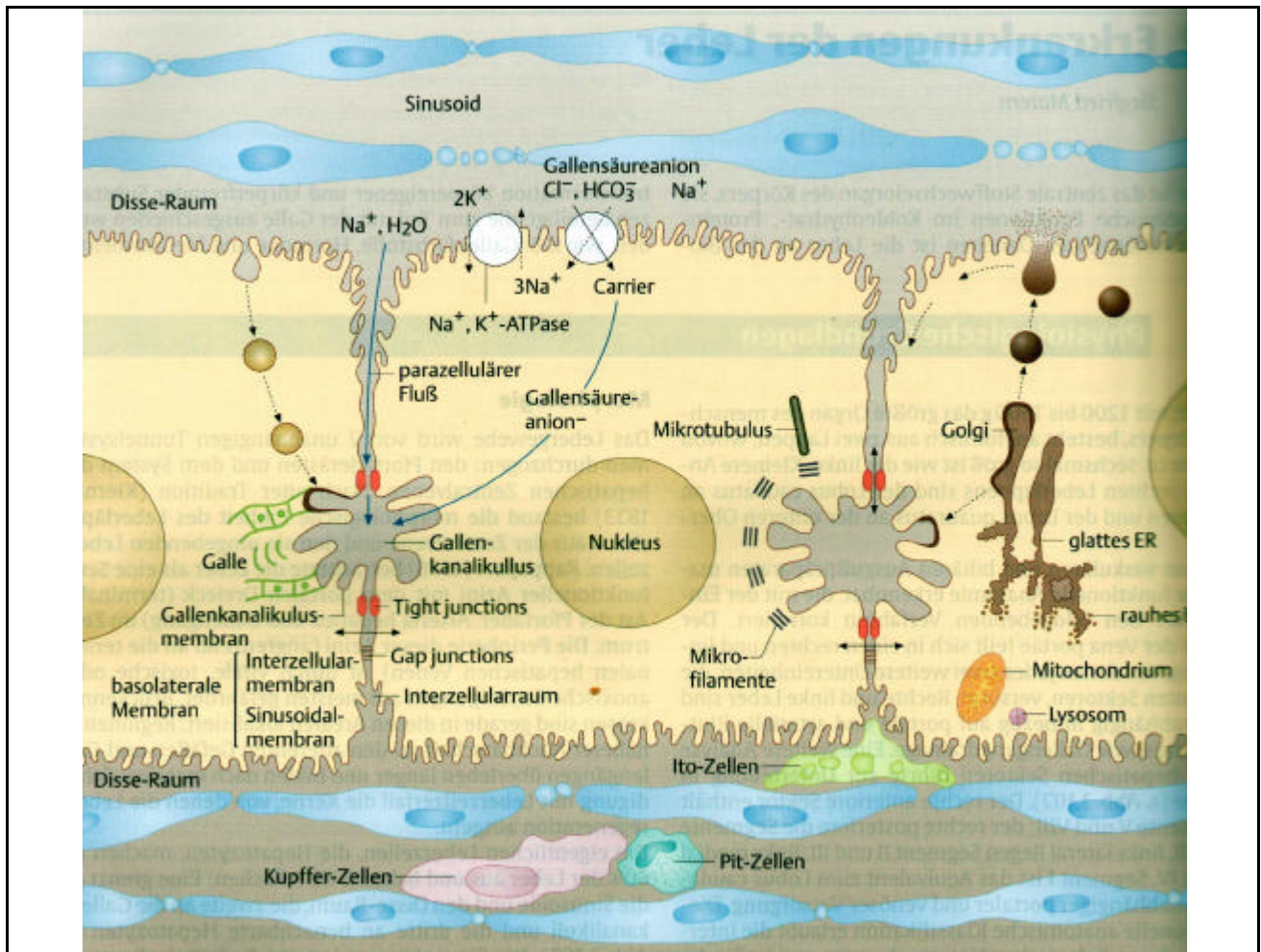


Abbildung 1-3: Zytologie der Leber: Die Hepatozyten werden von Gallenkanalgängen, benachbarten Hepatozyten und den Sinusoiden mit dem Disse-Raum umgrenzt. Phagozytoseaktive Kupfer-Zellen, die kolloidale Trägersysteme aufnehmen können, bevor diese die Hepatozyten erreichen, stellen eine wichtige Barriere auf dem Weg zu den Hepatozyten dar [32].

Zusammenfassung

Die Gentherapie eröffnet die Möglichkeit der Therapie von Krankheiten, die bisher nur unbefriedigend oder gar nicht behandelt werden können. Neben der kausalen Therapie können sich insbesondere Möglichkeiten zur Therapie der bisher in der Regel nur sehr unbefriedigend behandelbaren Tumorerkrankungen sowie viraler Erkrankungen -insbesondere HIV- ergeben. Lebererkrankungen sind eine weitere wichtige Indikationsgruppe für Gentherapeutika. Als zentrales Stoffwechselorgan des Körpers erfolgt in der Leber die Synthese zahlreicher Enzyme. Gendefekte dieser Enzyme führen zu Stoffwechselstörungen mit teilweise fulminanten Folgen. Substitutionstherapie oder klassische Pharmakotherapie ist bisher nur sehr begrenzt und unter großem Aufwand möglich, z. B.

beim Faktor IX-Mangel durch die Gewinnung des Blutgerinnungsfaktors aus biologischem Material.

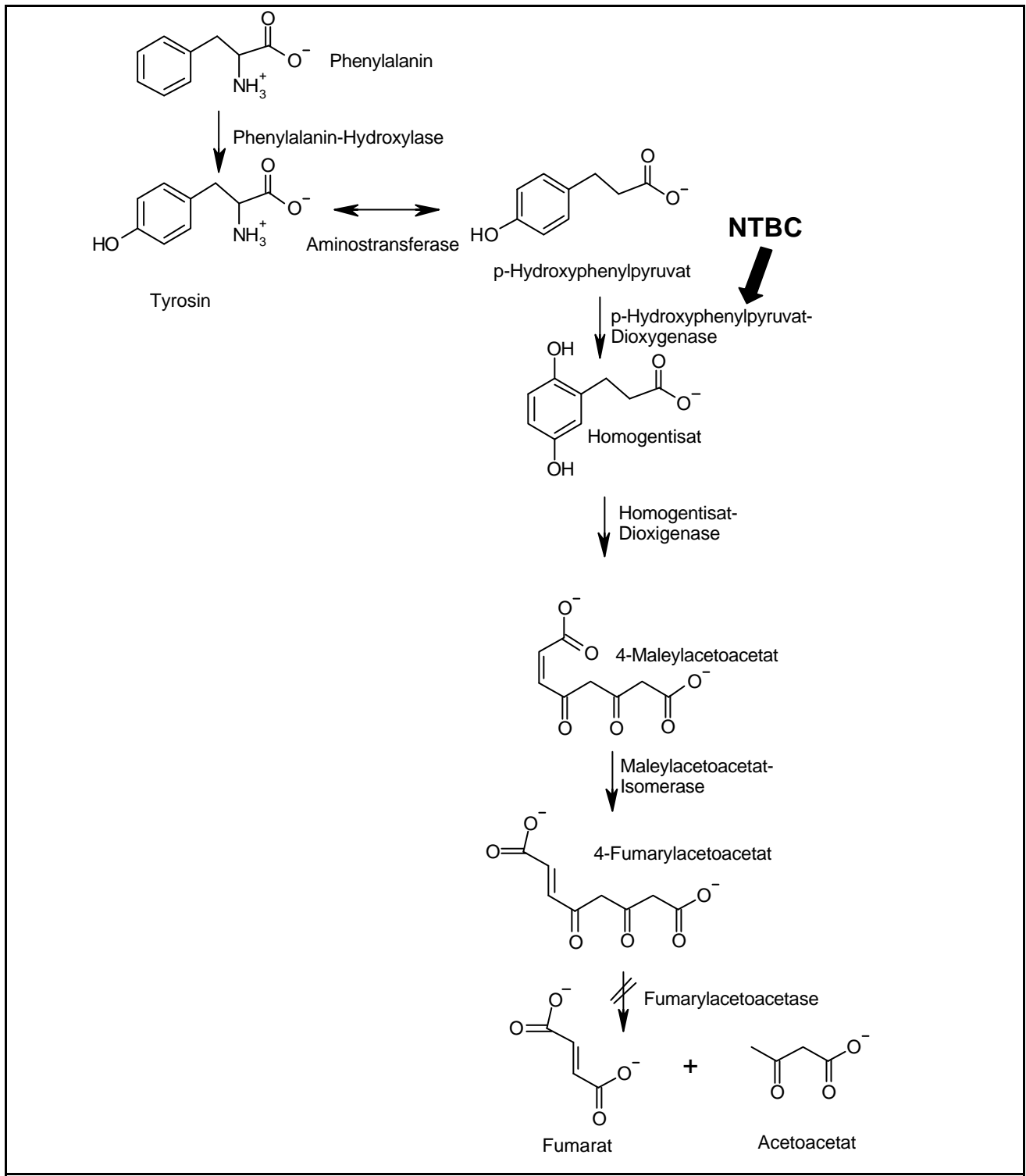


Abbildung 1-4: Stoffwechsel der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin [33]. Der Abbau erfolgt über sechs Stufen bis zu den Endprodukten Fumarat und Acetoacetat. Enzymmangel der Fumarylacetoacetase führt zum Krankheitsbild der Tyrosinose-Typ I. Pharmakotherapie erfolgt durch Blockade der p-Hydroxyphenyl-Dioxygenase mit NTBC. Ein Mangel dieses Enzyms verursacht das mild verlaufende Krankheitsbild der Alkaptonurie, die mit der Ausscheidung großer Mengen Homogentisinsäure einhergeht.

1.2 Genetisches Material für den Gentransfer

1.2.1 Nukleinsäuren als Arzneistoffe

DNA und RNA können als besondere *makromolekulare Arzneistoffe* mit einem hohen Anteil *negativer Ladungen* im Molekül angesehen werden, die selbst nicht oder kaum in der Lage sind, die Barriere der Zellmembranen zu überwinden.

Ein Grundprinzip der Regulierung des Stofftransports in Zellen hinein und aus Zellen heraus ist, dass die Membranen von Zellen sowohl durch integrale und periphere Proteine als auch durch negativ geladene Lipide eine negative Oberflächenladung aufweisen, um ein Konzentrationsgefälle kationischer Ladungen aufrecht erhalten zu können. Desweiteren ist der Transport des Arzneistoffes DNA über die Membran durch die Größe des Moleküls erschwert. Selbst mit den kleinsten Molekülen, die für Gentherapieversuche verwendet werden, (Oligonukleotiden mit einem Molekulargewicht von 5000 – 10000 Dalton) ist es nicht gelungen, durch chemische Modifikationen des geladenen Rückgrates Moleküle zu synthetisieren, die die Zellmembranen durch Diffusion durchdringen können. Deshalb müssen mit pharmazeutisch-technologischen Maßnahmen Trägersysteme zum Transport von genetischem Material in die Zelle bzw. in den Zellkern verwendet werden, deren Eigenschaften, Vor- und Nachteile im folgenden aufgeführt werden.

1.2.2 Genetische Defekte

Genetische Defekte können nur einzelne Basen betreffen, aber auch durch das Vorhandensein oder Fehlen ganzer Chromosomen verursacht sein. Die Mutationen lassen sich nach der Größe des betroffenen Anteils der Erbsubstanz einteilen in [34]

- Genom-Mutationen,
- Chromosomenmutationen und
- Genmutation (Punktmutation).

Bei **Genom-Mutationen** ist die Anzahl einzelner Chromosomen oder des kompletten Chromosomensatzes verringert oder erhöht (z. B. Trisomien). Hier ist eine Ursachenbehandlung durch somatische Gentherapie nicht möglich.

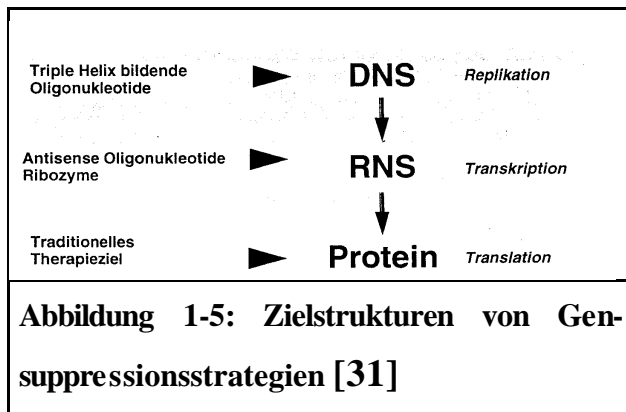
Die **Chromosomenmutationen** lassen sich einteilen in *Inversion* (Drehung eines Chromosomenabschnitts im Chromosom), *Duplikation* (Verdopplung eines Chromosomenabschnitts), *Dele-*

tion (partieller Verlust eines Chromosomenabschnitts) und *Translokation* (Austausch von Endstücken zwischen nicht homologen Chromosomen) [34].

Bei **Punktmutationen** ist nur eine einzelne Base vertauscht. Die Folge ist, dass bei der Proteinbiosynthese in der Regel ein Protein mit einer fehlerhaften Aminosäure synthetisiert wird. Gentherapeutische Maßnahmen zielen bei dieser Art von Gendefekten auf einen Austausch der mutierten Base im Genom der Zelle.

Während Gendefekte, bei denen ein Gendefekt eines größeren Bereichs auf dem Chromosom (z. B. Deletion) durch Substitution des betreffenden Gens erfolgen muß, kann bei Überexpression eines Gens durch Inhibieren der Genfunktion mittels Oligonukleotiden der Spiegel des synthetisierten Proteins herabreguliert werden [35].

1.2.3 Blockade der Genexpression



Die Blockade der Genexpression wird bei Mutationen angewendet, bei denen die Expression eines Gens verstärkt ist, z.B. wird bei Duplikationen vermehrt das Genprodukt des duplizierten Gens gebildet. Die Blockade kann auf zwei verschiedenen Ebenen stattfinden (Abbildung 1-5). Im Zellkern erfolgt durch tripelhelixbildende Oligonukleotide die Blockade der DNA-Replikation.

Antisenseoligonukleotide und Ribozyme verhindern die Transkription von DNA in mRNA.

Antisensestrategie mit einzelsträngigen DNA- oder RNA-Oligonukleotiden

Die Antisensestrategie hat das Ziel der Entwicklung von antiviralen und antitumoralen Arzneimitteln durch Herunterregulieren der Genexpression von überexprimierten Genen, z. B. von überexprimierten Wachstumsfaktoren, die zu einem vermehrten Zellwachstum führen. Für die Antisensestrategie werden einzelsträngige DNA- oder RNA-Oligonukleotide aus 15 – 28 Basen verwendet. Diese paaren mit den komplementären Zielstrukturen, um die Genexpression und damit die folgende Proteinsynthese zu hemmen [36].

Antisenseoligonukleotide werden schon seit langem für mechanistische Untersuchungen zur Blockade der Proteinsynthese als molekularbiologisches Werkzeug verwendet. Problematisch ist allerdings der schnelle intrazelluläre Abbau durch Nukleasen, die geringe zelluläre Aufnahme und

die Hybridisierung mit Zielstrukturen im Zytoplasma oder Nucleus, bevor es zur eigentlichen Reaktion mit den Zielstrukturen in der Zelle kommt.

Durch Modifizieren des Phosphat-Rückgrates konnte die Nukleaseresistenz der Oligonukleotide erhöht werden [37].

Die intrazelluläre Verteilung und der Metabolismus von ONs werden durch Fluoreszenzmikroskopie mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden und Zellfraktionierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden untersucht [36]. Die Verteilung in der Zelle ist abhängig von der Art der Oligonukleotide sowie von der Art der Applikation. Bei extrazellulärer Applikation erfolgt eine endocytotische Aufnahme. Die Oligonukleotide werden dann nur zytoplasmatisch aufgenommen. Es finden sich keine Oligonukleotide im Nucleus der Zelle (s. Literatur in 10.1). Lediglich bei Mikroinjektion in das Cytosol erfolgt auch ein nukleärer Transport der Oligonukleotide.

Tripelhelixoligonukleotide und Ribozym

Tripelhelixoligonukleotide interagieren mit spezifischen Sequenzen der genomischen DNA bei der Transkription und verhindern die Synthese der mRNA.

Ribozyme sind RNA-schneidende RNA-Moleküle, die die RNA vor der Proteinbiosynthese durch Anlagerung an die komplementäre Sequenz abbauen und damit eine Genexpression verhindern [38].

1.2.4 Genkonversion von Punktmutationen durch homologe Rekombination

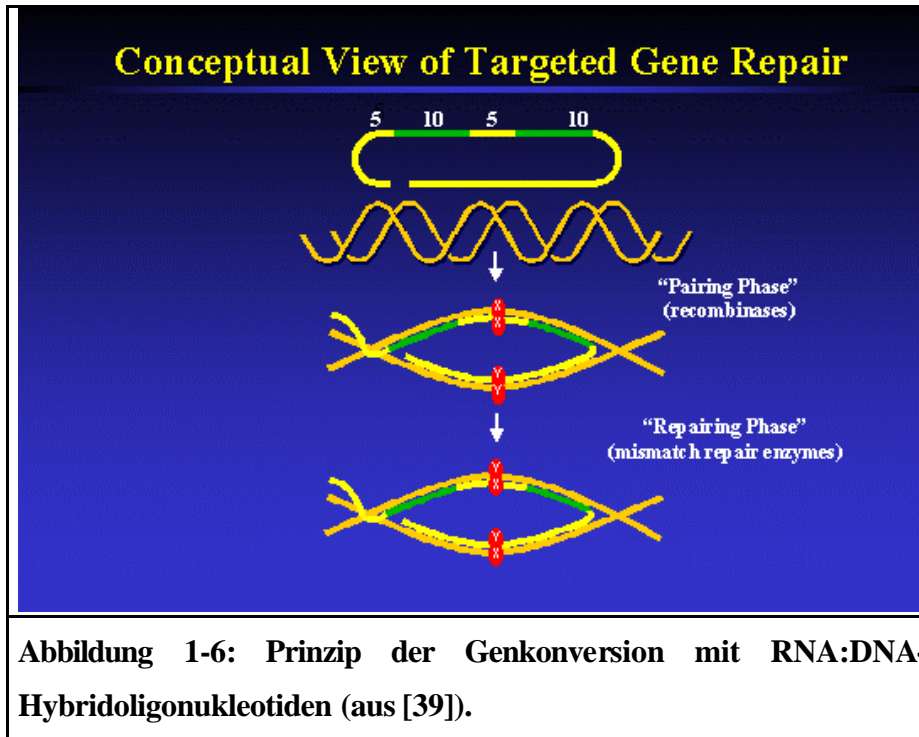
Unter "therapeutischem Gentergeting" wird die spezifische Interaktion von Nukleinsäuren mit Basensequenzen der zelleigenen Nukleinsäuren verstanden, wodurch die Expression von Genen modifiziert wird.

Der Nachteil des therapeutischen Gentergetings ist bisher die geringe Effizienz der biologischen Aktivität der DNA. Nur 10^{-5} bis 10^{-7} der transfizierten Zellen wurden mit der bisherigen Technik zielgerichtet mutiert [39].

In den Jahren 1993 und 1994 entdeckten Kmiec und Mitarbeiter, dass die Halbwertszeit von DNA-Molekülen, die mit homologen Regionen während der Synapsis paaren, verlängert werden kann, wenn der komplementäre Strang RNA-Abschnitte enthält [40-42]. Da die Basenpaarung zwischen den bis dahin verwendeten therapeutischen DNA-Molekülen und der zelleigenen DNA limitierender Faktor bei der homologen Rekombination ist, kann durch Kontrolle dieses Abschnitts die

Häufigkeit der Rekombination gesteigert werden. Diese Beobachtungen resultierten in der Entwicklung von den im folgenden beschriebenen RNA:DNA-Hybridoligonukleotiden (syn. Chimeraplast).

Das Ziel des "therapeutischen Gentargetings durch homologe Rekombination" ist der Ersatz eines defekten Nukleotids.



Genetische Defekte, die durch Mutation einer einzelnen Base verursacht sind, können mit chimären RNA:DNA-Hybridoligonukleotiden kausal behandelt werden. Diese Moleküle müssen in den Zellkern transportiert werden, anschließend erfolgt komplementäre Basenpaarung mit der genomischen DNA des Zellkerns. Reparatorenzyme im Zellkern

erkennen die fehlerhafte Basenpaarung mit dem entsprechend konstruierten Hybridoligonukleotid, so dass die fehlerhafte Base mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 50 % ausgetauscht werden kann.

RNA:DNA-Hybridoligonukleotide bestehen aus 68 Basen mit einem DNA- und einem RNA-Anteil. 5 zentrale DNA-Basen sind beiderseits von 10 2'-O-methylierten RNA-Basen umgeben. Die zentrale DNA-Base enthält die korrigierende Sequenz. Die RNA-Basen werden beiderseits von DNA-Basen gefolgt. Nach einem „4-T-hairpin loop“-d.h. 4 aufeinanderfolgende Thymidin-Basen- erfolgt intramolekulare Basenpaarung durch komplementäre Zusammensetzung der folgenden DNA-Basen, welches am 3'-Ende mit einem GCGCG-clamp endet (Abbildung 1-6).

Das Mischmolekül aus RNA- und DNA-Basen eines Phosphorthioat-Oligonukleotids bindet stärker an genomische DNA als ein Analogmolekül aus DNA oder 2'-O-methylierter RNA-Oligonukleotide [40, 43, 44]. Auch RNA:DNA-Hybridoligonukleotide ohne Rückgratmodifizierung zeigen gegenüber DNA-analogen Oligonukleotiden eine erhöhte Genkonversion [45]. Die O-Methylierung der Ribose erhöht die Stabilität des Moleküls, da die Affinität zu Nukleasen verringert ist. Der intramolekulare Doppelstrang, der durch den 4-T-hairpin loop ermöglicht wird, ist für die chemische und thermische Stabilität, sowie Resistenz gegenüber Nukleasen verantwortlich

[43]. Die defekte Basenpaarung wird vom Reparatursystem im Nucleus erkannt und durch Reparaturenzyme erfolgt Austausch der defekten Base, so dass die Punktmutation zum nichtdefekten Wildtyp konvertiert wird [46]. Der GCGCG-clamp stabilisiert die Sekundärstruktur des Hybridoligonukleotids und vermindert den Abbau durch intrazelluläre Exonukleasen [44, 47].

Über die Verwendung von RNA:DNA-Hybridoligonukleotiden als möglichen Ansatz zur Therapie von Punktmutation ist erstmals 1996 berichtet worden [44, 47]. Es konnte für zahlreiche Zelllinien mit verschiedenen Trägersystemen für verschiedene Punktmutationen gezeigt werden, dass bis zu 40 % Konversion der defekten Base in die Wildtypform möglich ist. Die Tabelle 1-1 gibt einen Überblick über die bisherigen Arbeiten auf diesem Gebiet. Es konnte nicht nur der Nachweis der Konversion in der Zelle erbracht werden, sondern auch der funktionelle Nachweis der erfolgreichen Konversion durch klinische Analytik des Gerinnungsstatus nach Konversion im mutierten Faktor-IX-Gen erbracht werden [48].

Der Nachweis der Genkonversion erfolgt nach PCR-Amplifizierung der genomischen DNA durch Sequenzierung des amplifizierten DNA-Abschnitts [47]. Die Möglichkeit der Crosskontamination von Zellen kann nicht ausgeschlossen werden [49-51]. Durch Nachweis der Mutation auf Stufe der Proteinsynthese konnte der Nachweis eines funktionierenden Proteins erbracht werden [52, 53].

Zellen	Gene	Träger	Zeit [h]	Nachweis	Resultat	Jahr	Literatur
Hefe	Iso-1-Cytochrom c-Gen				(+)	1988	[50]
CHO	extrachromosomales humanes alkalisches Phosphatase-Gen	Lipofectin®	24	Plasmidtransfektion (Lipofectin®); Southern blot, PCR, Sequenzierung des mutierten Plasmids	+	1996	[40]
lymphoblastoid cells (B cells) homozygous for β^S mutation	humanes β -Globin-Gen	DOTAP	6	PCR basiertes RFLP; Southern-Blot-Hybridisierung, Sequenzierung	erfolgreich	1996	[43]
TK6 cells					nicht erfolgreich		
K562 cells					teilweise erfolgreich		
CD34 ⁺ angereichert Stammzellen	β -Globin-Gen	DOTAP	16	PCR, Digestion, Sequenzierung	+	1997	[51]
HuH-7 human hepatoma cell line	alkalisches Phosphatase-Gen	PEI 800 kDa	48	PCR, Southern Blot, Sequenzierung	+	1997	[41]
		LPEI 800 kDa			+		
		LPEI 25 kDa			++		
Ratte	Faktor IX-Gen	PEI 800 kD		Enzymaktivität	+	1998	[51]
		LPEI 25 kDa			+		
HuH-7	Modelloligonukleotide CAT-Plasmid	PEI 800 kDa DOPC:DOTAP: Gc DOPS:DOPC:Gc DOPS:DOPC:Gc	48	CLSM	+	1997	[47]
Primäre Rattenhepatozyten	Faktor IX-Gen	PEI LPEI DOPC:DOTAP: Gc DOPS:DOPC:Gc DOPS:DOPC:Gc	24-48	PCR, Klonieren in Plasmid-Vektor, Vermehrung in Bakterien, Southern blot, Sequenzierung	+	1999	[44]
Ratte		LPEI PEI/LPEI		Faktor IX-Aktivität (Thromboplastinzeit)		1999	
Duchene-Muskeldystrophie Hundemodell	mdx-Punktmutation			Western Blot	+	1998	[48]
tubuläre Nierenzellen	Carboanhydratase II-Mutation			Western Blot			[49]
Tabakzelllinie	ALS-Gen			Überleben in toxischem Medium über mehrere Zell-	+	1998	[52]

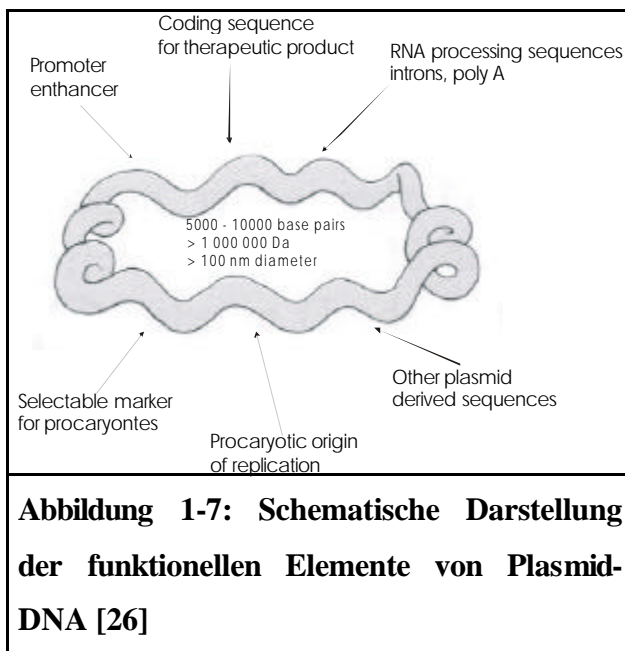
Tabakzelllinie		GenGun		generationen		1999	[50]
	ALS-Gen		3-10 d	PCR, Sequenzierung;	+		
				Zellmassenänderung in Selektivmedium			
GFP-plasmidtransformierte Tabakzelllinie	GFP-Gen			Fluoreszenzmikroskopie	+		
Maiszelllinie	AHAS-Gen	Gen Gun		PCR, RFLP,	(+)	1999	[53]
GFP-plasmidtransformierte Maiszelllinie	GFP-Gen		4 d	Fluoreszenzmikroskopie	+		
E. coli	Mutation in Antibiotikaresistenzgen in einem Plasmid			Überleben der Bakterien in antibiotikahaltigem Medium	+	1998	[54]
melan c-cells	Tyrosinase	Lipofectamin [®]	bis 2 Wochen	Proteinnachweise über Zellpigmentierung; Klonierung, RFLP, Sequenzierung; Western blot	-	1998	[48]
		Lipofectin [®]			-		
		DMRIE			-		
		LT1			-		
		Superfectin			+		
		Cytofectin			+		
		Electroporation			-		

Tabelle 1-1: Literaturzusammenfassung zu Genkonversionsversuchen mit Hybridoligonukleotiden. Erfolgreiche Hybridoligonukleotidtransfektionen konnten für tierische Zellen, Pflanzenzellen und Bakterien erzielt werden. Als Modellsystem hat sich die Genkonversion von GFP-plasmidtransformierten Zellen erwiesen. Auch in Tiermodellen an Ratte und Hund konnte eine erfolgreiche Konversion einer Einzelbasenmutation nachgewiesen werden.

1.2.5 Gensubstitution mit Plasmiden

Während mit Oligonukleotiden und Ribozymen nur eine Inhibierung von exprimierten Genen möglich ist, stellen Plasmide bisher die einzige Möglichkeit dar, defekte Gene in Zellen zu ersetzen. Daher ist der plasmidvermittelte Gentransfer der am weitesten verbreitete Ansatz zur Entwicklung von Gentherapiesystemen für die Substitutionstherapie.

Struktur und Eigenschaften von Plasmiden



Plasmide sind hochmolekulare DNA-Moleküle von 5000 bis 10000 bp Länge. Sie enthalten einen Replikationsursprung, Antibiotikaresistenzgene, therapeutische Gene oder Modellgene, Transkriptionsinitiationssignale, Terminierungssignale und ein Polyadenylierungssignal. Die Vermehrung von Plasmid-DNA erfolgt in Bakterien. Durch eine Ionenaustauschchromatographie wird die Plasmid-DNA von der genomischen DNA der Bakterienzelle getrennt und durch alkoholische Fällung gewonnen.

Transkriptionsinitiationssignal, Terminierungssignal, Polyadenylierungssignal

Der prokaryotische **Replikationsursprung** (Promoter) ist eine Sequenz, die als Startsignal für Replikationsenzyme dient, um das Plasmid in Bakterien vermehren zu können. Verwendet werden CMV (Cytomegalie-Virus)-Promoter oder SV40 –Promoter.

Antibiotikaresistenzgene sind wichtig für das Selektieren von transformierten Bakterien. Nur plasmidhaltige Bakterien können in antibiotikahaltigen Nährmedien überleben. Tetracyclin- und Ampicillinresistenzgene sind Bestandteil von Plasmiden.

Als **Reportergene** werden Gene eingesetzt, die leicht durch chemische oder biophysikalische Reaktionen in der Zelle nachweisbar sind [54].

Das ***b-Galactosidase-Gen*** kodiert das Enzym β -Galactosidase, dessen Aktivität über eine chemische Farbreaktion in der Zelle nachgewiesen werden kann.

Eine Neuentwicklung auf dem Gebiet der Reportergene ist das „***green fluorescent protein***“ (***GFP-Gen*** [55, 56] und „***enhanced green fluorescent protein***“ (***eGFP-Gen*** [57]). Dieses Gen

kodiert ein grün fluoreszierendes Protein, welches durch fluorimetrische Methoden nachgewiesen werden kann. Vorteil ist, dass keine chemische Nachweisreaktion in der Zelle mehr erfolgen muß und der Erfolg einer Transfektion fluoreszenzmikroskopisch erfaßt werden kann. Allerdings ist das fluoreszierende Protein in hohen Konzentrationen toxisch und führt im Tier zu Immunreaktionen [58].

Modifizierte Plasmide

Fluoreszenzmarkierung von Plasmiden

Die Aufnahme von DNA in die Zelle und der intrazelluläre Transport in den Nucleus konnte bisher nur durch Behelfsmethoden durchgeführt werden, weil alle Methoden sowohl zum direkten Modifizieren durch Photolyse, Nick Translation oder Nukleotidanaloga der DNA auch zu einer Veränderung der Struktur der DNA führten. Bei der Nick Translation wird durch Dnase I ein Bruch von Einzelsträngen herbeigeführt. Anschließend entfernt die Exonuklease DNA-Polymerase I von *E. coli* Nukleotide von der Bruchstelle und synthetisiert gleichzeitig einen neuen Strang, wobei dann auch modifizierte Nukleotide, die in dem Reaktionsgemisch anwesend sind, eingebaut werden. [59].

Durch PNAs (peptide nucleic acids) können Plasmide auch fluoreszenzmarkiert werden, ohne dass die überdrillte Konformation von Plasmiden verloren geht. Dazu wird eine polyAG-Sequenz in das Plasmid kloniert, an welches komplementär konstruiertes und fluoreszenzmarkiertes PNA gebunden wird. Dieses DNA-Konstrukt zeigt dieselbe in-vitro-Transfektionsaktivität wie das unmodifizierte Plasmid. Bei Verwendung eines GFP-Plasmids lassen sich so intrazellulär die Kinetik und Verfügbarkeit sowohl des Plasmids als auch des Genprodukts verfolgen [60]. PNAs sind Analoga von Nukleinsäuren, bei denen das Rückgrat, welches bei den Nukleinsäuren aus Estern der Phosphorsäure mit den Zuckern Ribose oder Desoxyribose besteht, durch ein Rückgrat mit peptidischen Amidbindungen ersetzt wurde. Daher sind PNAs ungeladene Makromoleküle.

Weiterhin ist eine Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren ohne Änderung der Konformation und biologischen Aktivität durch das Reagenz LabelIt™ (PanVera Comp., Madison, WI, USA) möglich. Durch Modifizieren von Guaninbasen an einer Stelle, die nicht an der Basenpaarung beteiligt ist, wird ein funktionsfähiges fluoreszenzmarkiertes Produkt erhalten.

NLS = nuclear localization sequence

Die Kernmembran von eukaryotischen Zellen ist für Moleküle bis 9 nm Durchmesser permeabel. Die minimalste Größe von Plasmid-Kondensaten konnte für PEI-DNA-Komplexe mit einer

Größe von 25 nm erzeugt werden [61]. Komplexieren mit kationischen Lipiden führt zu Komplexen von > 200 nm Durchmesser. Daher ist der Kerntransport ein limitierender Faktor für den effizienten Transport von an Hilfsstoffen gebundenem genetischem Material.

Das basische Peptid des „SV 40 large tumor antigens“ ist eine Kernerkennungssequenz (NLS = nuclear localization sequence). Diese Sequenz vermittelt die Bindung des „karyophilen Proteins“ an Importin α . Dieser Komplex wird dann an Importin β gebunden. Der ternäre Komplex wird –katalysiert durch die GTPase Ran- in den Nucleus transportiert. Makromoleküle bis 25 nm konnten so in den Zellkern transportiert werden [61].

Gentransferversuche mit DNA, welche mit NLS-enthaltende Genträgersystemen komplexiert wurden oder an karyophile Proteine gebunden wurden, scheiterten aber daran, dass die NLS am Trägersystem für die DNA gebunden war und im Verlauf der intrazellulären Prozessierung DNA vom Trägersystem gelöst wurde, so dass der Targetingeffect verloren ging.

1.3 Methoden des zellulären Transfers von genetischem Material

Ein Blick in die Natur zeigt, dass es schon nahezu perfekte Fährten gibt, um DNA gezielt in den Zellkern zu bringen, nämlich die Viren. Es ist daher naheliegend, therapeutische DNA in das virale Genom einzubauen und die Transporteigenschaften der Viren auszunutzen, um DNA gezielt in den Nucleus zu transportieren. Den genialen Transporteigenschaften stehen aber Nachteile gegenüber. Es ist zunächst einmal das Ziel der Viren, ihr eigenes genetisches Material mit Hilfe der zellulären Replikationsmechanismen zu vermehren, um dann nach Rekonstitution neuer Viren weitere Zellen zu infizieren, so dass es schwierig ist, die Virusvermehrung im Körper zu kontrollieren. Desweiteren haben die Wirtsorganismen Abwehrmechanismen gegen Viren entwickelt, die beim Menschen mit Immunantworten einhergehen.

Daher ist man bemüht, Alternativstrategien zu entwickeln. Meilensteine in der Entwicklung von nichtviralen Trägersystemen sind die Entwicklung des ersten kationischen Lipids durch Felgner et al. [62] sowie die Einführung des Polymers Polyethylenimin durch Boussif et al. [63] zur Kondensation der DNA.

In der Abbildung 1-8 sind die verschiedenen gentherapeutischen Verfahren zusammengefaßt.

Methode	Gruppe		
Mechanisch	Mikroinjektion		
	Gene gun		
	Scharfe Nadeln		
Physikalisch	Elektroporation		
	Ultraschall		
	Osmotischer Schock		
	Gefriertrocknung		
Chemisch	multivalente Kationen	Ca ²⁺	[67]
		Mn ²⁺	
		Co(NH ₃) ₆ ³⁺	[64]
		La ³⁺	
	Oligoamine	Spermin	
		Spermidin	
	Kationische Polypeptide	Protamin	[68]
		Polylysin (PLL)	
		Galactose-PLL	[65]
		Lactose-PLL	[66]
		Lipopolyamine	[69]
		Histone	[70]
	Polymere	PEI	[60]
		Lactose-PEI	[66]
		Mannose-PEI	[67]
		Dendrimere	[71]
	Kationische Lipide / Liposomen	s. Abbildung 1-9	
	nichtkationische Liposomen	Negativ geladene Liposomen	[72]
		AVE™	[73]
		LPD II	[74]
Biologisch	viral	Retroviren	
		Adenoviren	
		Adenoassoziierte Viren	
		Herpes-simplex-Viren	
	bakteriell		

Abbildung 1-8: Überblick über die Methoden des Gentransfers

1.3.1 Mechanische Methoden

Die mechanischen Methoden des Gentransfers haben für die therapeutisch-medizinische Anwendung keine Bedeutung, weshalb diese Methoden hier nur erwähnt werden. Anwendung finden die mechanischen Methoden insbesondere in mechanistisch-biologischen Untersuchungen zur Genfunktion und Expression. Die Zerstörung der Integrität der Zelle ist mit der medizinisch-therapeutischen Anwendung nicht vereinbar. Weitverbreitet sind die mechanischen Methoden des Gentransfers bei der Transfektion von Pflanzenzellen [53, 65].

1.3.2 Physikalische Methoden

Die Injektion von nackter DNA führt v.a. in der Muskelzelle zu einer ausgeprägten Expression des injizierten Gens [66]. Die Genexpression in Muskelzellen wird in klinischen Studien für DNA-Impfstoffe untersucht [67]. Weiterhin ist durch Injektion von nackter DNA eine Genexpression in Herzmuskelzellen und Leberzellen nachweisbar [68].

1.3.3 Virale Trägersysteme

Unter den biologischen Trägersystemen besitzen nur die viralen Trägersysteme praktische Bedeutung für die Entwicklung der Gentherapeutika. Im folgenden Abschnitt werden Vor- und Nachteile der viralen Trägersysteme dargestellt.

Die viralen Trägersysteme werden am längsten eingesetzt und haben –zumindest was die Anzahl der klinischen Studien betrifft- die größte Bedeutung. Die bisher am häufigsten verwendeten viralen Trägersysteme sind

- Retroviren,
- Adenoviren,
- Adenoassoziierte Viren und
- Herpes-simplex-Virus-1 (HSV-1)

In das virale Genom wird die zu transferierende DNA eingebaut. Durch Deletionen und Rekonstitutionen wird versucht, nichtinfektiöse Trägersysteme zu erhalten. Die Applikation ist parenteral und inhalativ möglich.

Retroviren waren die ersten viralen Vektoren für die Gentherapie und werden am häufigsten für den viralen Gentransfer verwendet. Diese RNA-Viren bauen bis zu 10 kb des genetischen Materials unspezifisch in das Genom ein [69]. Durch Aktivierung von Protoonkogenen oder Inakti-

vierung von Tumorsuppressorgenen bei der Anwendung dieses viralen Trägersystems ist das Problem der möglichen Karzinogenese bisher nicht befriedigend geklärt [70-72]. Eine Kontamination mit Wildstammviren kann bisher nicht ausgeschlossen werden [73]. Die verwendeten Retroviren können sich nicht selbstständig vermehren und benötigen eine Mäusezelllinie zur Vermehrung. Eine Insertion in das zelleigene Genom erfolgt nur während der Zellteilung.

Die **Adenoviren** sind doppelsträngige DNA-Viren und gehören zu den Erkältungsviren und sind daher ungefährlicher. Aufgrund ihrer Spezifität zu den Luftwegen sind sie vor allem für die pulmonale Applikation geeignet [74]. Ein Vorteil gegenüber den Retroviren kann sein, dass die DNA nicht in das Genom eingebaut wird, sondern episomal im Nucleus verbleibt. Es können Fragmente bis 7,5 kb in den Nucleus eingeschleust werden [75]. Die DNA wird auch in sich nicht-teilende Zellen eingebaut. Zahlreiche Menschen sind auch bereits gegen dieses Virus immun, spätestens nach der zweiten Injektion desgleichen Virusstammes. Die Genexpression ist mit adenoviralen Vektoren höher als mit bisherigen nichtviralen Vektoren [76].

Weiterhin werden **adenoassoziierte Viren (AAV)** eingesetzt. Sie können sich nur mit Hilfe von Adenoviren oder Herpesviren replizieren. Die Gefahr von Immunreaktionen oder Mutagenese ist deutlich reduziert. AAV insertieren das genetische Material in eine nicht transkribierte Stelle des 19. Chromosoms. Eine Zellteilung wird für die Expression nicht benötigt. Nachteilig ist ihre geringe Ladungskapazität unter 4 kb und die geringe Transfektionseffizienz.

Herpes-simplex-Virus-1 (HSV-1) infiziert ebenfalls sich nicht teilende Zellen und könnte Anwendung zum Gentransfer in Neurone oder frühe hämatopoetische Stammzellen finden.

1.3.4 Chemische Trägersysteme

1961 wurde von Amos über die Erhöhung der RNA-Aufnahme in der Zellkultur durch Protamin berichtet [77]. Die Calciumphosphat-Präzipitation wird seit Ende der 60er Jahre für die Transfektion verwendet, aber nicht mit dem Ziel der Entwicklung von Gentherapeutika, sondern als molekularbiologische Methode zur Transformation von Zellen.

Als chemische Trägersysteme werden kationische Lipide, kationische Peptide und kationische Polymere verwendet. Die Komplexe der Nukleinsäuren werden als Lipoplexe (DNA + kationische Lipide) bzw. Polyplexe (DNA + kationische Polymere) bezeichnet.

Kationische Lipide

Nach den viralen Trägersystemen sind die meisten humanen Gentherapiestudien mit Präparationen aus kationischen Lipiden durchgeführt worden. Synthese und Gentransfer in Zellkulturstudien sind erstmalig für das erste kationische Lipid *DOTMA* 1987 beschrieben worden [62]. Die Formeln der wichtigsten kationischen Lipide sind in Abbildung 1-9 zusammengefaßt. Die quartäre Ammoniumverbindung wird mit den Fusogen Diolelphosphatidylethanolamin (*DOPE*) kombiniert (*Lipofectin™*). Ebenso wie beim *DOTMA* ist auch beim *DMRIE* das Glycerolrückgrat mit Fettalkoholen verethert. Durch Ethoxylierung am Stickstoff konnte die Transfektionseffizienz gesteigert werden. Von einer Reihe von Fettalkoholanaloga erwies sich das Myristinalkoholderivat als sehr effektiv [78], was mit der Fluidität der kurzkettigen gesättigten Fettsäure im Vergleich zu langkettigen gesättigten Fettsäurederivaten erklärt werden kann. Myristinsäure- und Ölsäurederivate haben Phasenübergangstemperaturen, die deutlich unter 37 °C liegen. Die Lipide liegen somit im flüssig-kristallinen Zustand vor, der eine Wechselwirkung mit Biomembranen erleichtert

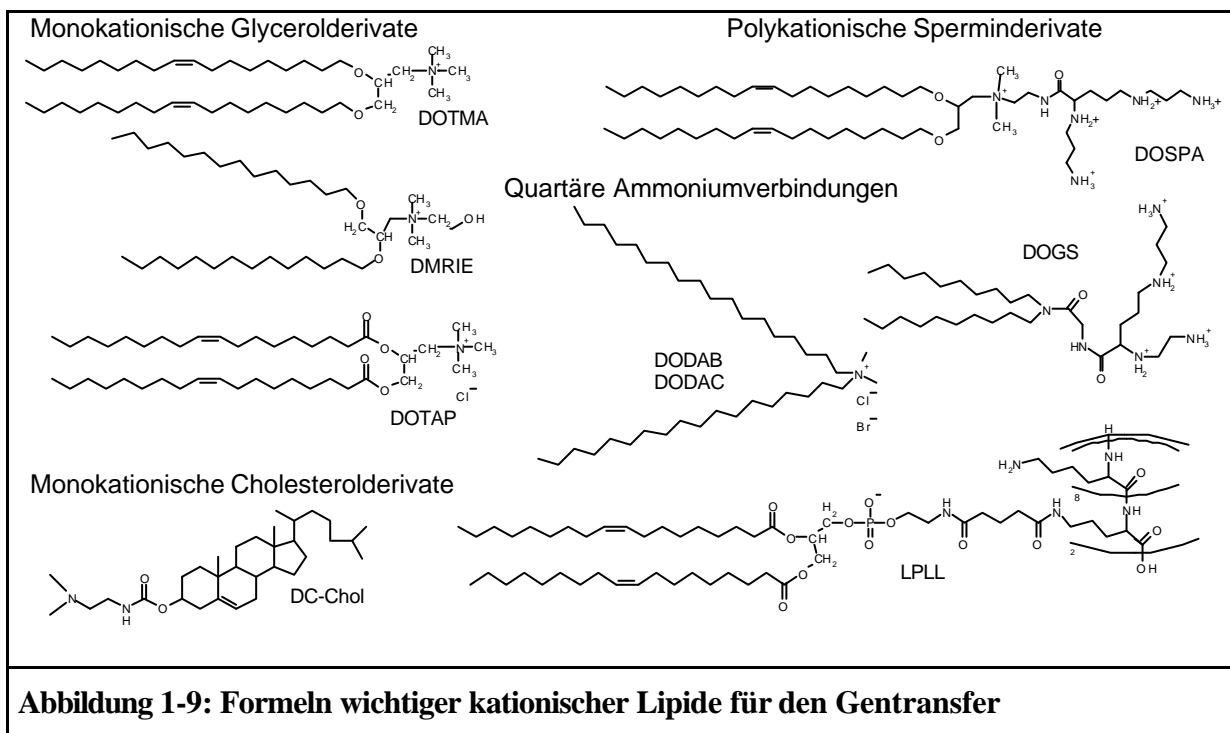


Abbildung 1-9: Formeln wichtiger kationischer Lipide für den Gentransfer

Im Gegensatz dazu ist *DOTAP* ein Fettsäureester von zwei Ölsäuremolekülen mit einem quarternisierten azaanalogen Glycerol [79]. Dadurch ist die bessere Bioabbaubarkeit von *DOTAP* und die geringere Toxizität von *DOTAP*-Präparationen begründet. Durch Zugabe von Helfermolekülen (*DOPE*, Cholesterol und Kombination der beiden Helfermoleküle) wird in Zellkulturexperimenten bereits bei einem geringen Überschuß kationischer Ladung das Transfektionsoptimum erreicht. [36]. Weiterhin sind *DOTAP*-DNA-Konstrukte nicht serumempfindlich [80].

1990 wurde die Synthese von *DC-Chol* beschrieben [81]. Bereits im Jahr 1995 ist dann ein erster klinischer Gentherapieversuch -der erste mit kationischen Lipiden- durchgeführt worden, bei dem gezeigt werden konnte, dass der Gentransfer mit Lipoplexen ein sicherer Weg sein kann.

Eine Erhöhung der Transfektionseffizienz konnte durch die Substanzgruppe der ***Lipopolyamine*** erzielt werden. Die Lipopolyamine stellen die Brücke zwischen den kationischen Lipiden und kationischen Polymeren her. Durch das Koppeln der 3fach bzw. 4fach kationischen Amine Spermin bzw. Spermidin, die als Gegenionen der DNA in der Zelle vorkommen, an das Glycerolrückgrat der kationischen Lipide bzw. an die Aminalkohole der quartären Ammoniumverbindung DODAB werden die mehrfach positiven liposomenbildenden Lipide *DOSPA* und *DOGS* (Transfectam™) erhalten [82]. Mit *DOGS* ist auch eine Transfektion in Serum möglich [63].

Seither sind Dutzende verschiedener kationischer Lipide synthetisiert worden [26, 54, 83]. Es konnten Struktur-Wirkungsbeziehungen durch systematische Variation von lipophiler Domäne, Länge der Brücke zwischen hydrophilem und hydrophobem Molekülteil sowie Anzahl und Art der Ladungsträger im Molekül aufgestellt werden. Wesentliche Fortschritte im Verständnis des lipid-vermittelten Gentransfers konnten aber nicht erzielt werden.

Lipopolylysin (LPLL) ist eine polykationische Verbindung, bei der über Glutarsäure Polylysin an das Lipid gekoppelt ist. Es stellt ebenfalls eine chimäre Verbindung zwischen den kationischen Lipiden und Polymeren dar [84].

Biopharmazie und klinische Studien von Formulierungen kationischer Lipide

Radioaktiv markierte DNA-Lipid (*DOTIM/Chol*)-Komplexe akkumulieren in Leber, Lunge und Knochen von Mäusen nach i.v.-Applikation. Es konnte kein Unterschied zwischen offenzirkulärer und überdrillter Konformation des Plasmids nachgewiesen werden [85]. Innerhalb von 60 Minuten nach Injektion von kationischen Lipid/DNA-Komplexen kann die Genexpression durch Nachinjektion von negativ geladenen POPG / Chol-Liposomen vermindert werden [86]. Die Vielzahl der bisher durchgeführten Studien zeigt, dass eine Korrelation von Zellkulturversuchen auf die Bedingungen im Lebewesen nicht möglich ist. So sind DOTAP / DOPE-Komplexe unter *in-vivo*-Bedingungen weniger transfektionseffektiv als DOTAP / Chol-Komplexe, die wiederum unter *in-vitro*-Bedingungen eine geringere Transfektionseffizienz aufweisen [87], eventuell erklärbar über den membranstabilisierenden Effekt des Cholesterols. DOPE-haltige Präparationen können unter *in-vivo*-Bedingungen wegen zu geringer Komplexstabilität zu ineffizient sein.

Klinische Studien sind mit den kationischen Lipiden DC-Chol [88], DMRIE [89], DOTAP [90] und DORIE durchgeführt worden. Diese Studien konnten nicht den Erfolg des kationisch-

lipidvermittelten Gentransfers zeigen. Es konnte aber zumindest die prinzipielle Sicherheit der Gentransfersysteme gezeigt werden.

Polypeptide

Protamin

Protamine sind basische Proteine, die in den Zellkernen der Spermien von 50 Fischarten nachgewiesen worden sind. Nukleohistone kommen in den Kernen von somatischen Zellen von Tieren vor.

DNA-Kondensation ist ein notwendiger Prozess, damit die DNA in den Zellkern von tierischen und pflanzlichen Zellen hineinpaßt. In Säugetierzellen sind es basische Nukleoproteine, die die DNA in einen kompakten Zustand bringen.

1870 wurde von Miescher in Eiter eine phosphatreiche Proteinfraction entdeckt, die er „nucleins“ nannte. In Spermienköpfen vom Rheinlachs fand er das „nuclein“ kombiniert mit Stickstoffbasen in einer salzartigen Bindung. Die Stickstoffbase bezeichnete er als „protamine“. Die Proteinstruktur des „protamine“ wurde aber erst 20 Jahre später nachgewiesen. Kossel benutzte dann den Namen „protamines“ für basische Proteine aus den Kernen von Fischspermienzellen. Kossel hat in den roten Blutzellen der Gans eine ähnliche salzartige Verbindung gefunden. Desweiteren sind in reifen Hoden zahlreicher Fischarten weitere verschiedene Protamine gefunden worden [91].

In den Spermien von Fischeiern liegt ein neutraler Komplex aus DNA und Protamin vor [92].

Protamine enthalten nur wenige Aminosäuren. Als basische Aminosäure ist Arginin Bestandteil aller Protamine. Alanin und Serin kommen in allen bekannten Protamin-Arten vor, meistens auch Prolin und Valin. Glycin und Isoleucin sind häufig Bestandteil der Aminosäuresequenz, Threonin ist nur selten in der Sequenz vorhanden.

Bereits 1963 wurde festgestellt, dass Protamin für den Transport von RNA und DNA in den Zellkern verwendet werden kann [93-95]. Seitdem ist aber Protamin nur wenig als Träger für DNA verwendet worden. Es wurde gezeigt, dass sich mit Protamin der kationisch-lipidvermittelte Gentransfer steigern läßt [96]. Desweiteren konnte bereits für ein Transfektionssystem aus negativ geladenen Liposomen (AVE™) mit fusogenen Eigenschaften ein effizienter Gentransfer in Anwesenheit von Serum in HepG2-Zellen gezeigt werden [97].

Polymere

Lipopolyamin

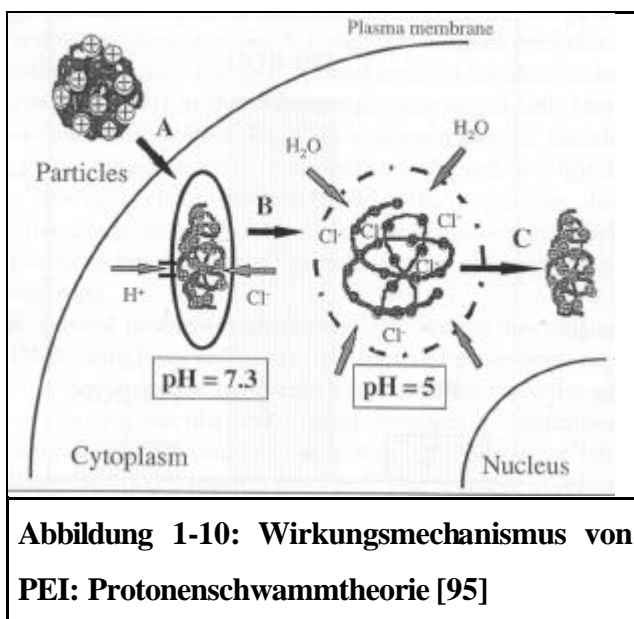
Die Lipopolyamine, bei denen ein oligomerer Aminanteil an eine kationische Lipidstruktur gebunden ist, ist bereits bei den kationischen Lipiden dargestellt worden.

Polylysine

Das Polylysins (PLL) ist ein Polymerisierungsprodukt des Lysins und stellt damit eine Verbindung zwischen den kationischen Peptiden und kationischen Polymeren dar. PLL wird vielfach zur Entwicklung von Gentransfersystemen für das spezifische Zelltargeting entwickelt, weil an die ϵ -Aminogruppe des Lysins zahlreiche Liganden gekoppelt werden können.

PEI

Polyethylenimin (PEI) ist ein Polymerisat des Aziridins, welches durch ringöffnende Poly-



merisierung des Monomers dargestellt wird. PEI unterscheidet sich von den kationischen Lipiden und den anderen kationischen Polymeren durch einen besonderen Wirkungsmechanismus. Durch die Erniedrigung des pH-Werts im Lysosom quillt das Polymer auf und bringt das Lysosom zum Platzen unter Freisetzung des DNA/PEI-Komplexes (Abbildung 1-10). Dadurch wird die DNA vor enzymatischen Abbau durch lysosomale DNAsen geschützt [63]. PEI ist genauso effizient wie DOGS. Bis zu einem Ladungsverhältnis von 18 konnte kein signifikanter Anstieg der To-

xizität mit dem MTT-Test nachgewiesen werden.

Desweiteren konnte für PEI ein nukleärer Transport von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden gezeigt werden [63].

Eine modifizierte PEI Transfektionsprozedur, bei der niedermolekulares PEI zu PEI-kondensierter DNA zugegeben wird und anschließend freie PEI-Moleküle aus dem Transfektionsansatz entfernt werden, führt zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz um 43 % [98].

Targeting mit Lipoplexen und Polyplexen

Durch zellspezifisches Targeting soll die Aufnahmerate der DNA in die Zielzellen erhöht werden. Die Polymere PLL und PEI können durch Kopplung von Liganden über Linkermoleküle chemisch derivatisiert werden. Durch Targeting des Asialoglykoproteinrezeptor auf der Oberfläche von Hepatozyten mit Asialoglykoprotein-PLL [29], lactosylierten oder galactosylierten Derivaten von PEI [99] und PLL [100, 101] konnte die Spezifität der Aufnahme in die Hepatozyten erhöht werden, so dass die Zellspezifität der Genexpression nach erfolgreicher Transfektion gesteigert werden kann.

Nichtvirale nichtkationische Trägersysteme

Neben der direkten Applikation von mit Polykationen oder kationischen Lipiden komplexierten kationisierten Nukleinsäurenkomplexe können diese Komplexe anschließend mit kationischen oder nichtkationischen Liposomen umhüllt werden.

Artificial viral envelopes (AVE™) sind negativ geladene liposomale Formulierungen, deren Lipidzusammensetzung der Zusammensetzung viraler Hüllen in modifizierter Form entspricht [102]. Mit diesen negativ geladenen Virushüllmembranlipiden werden dann die protamin- oder PEI-kondensierten Nukleinsäuren umhüllt. Durch Einlagerung von Fusionspeptiden oder Peptiden zum spezifischen Targeting von Zellen wird so ein Transfektionssystem erhalten, welches wie ein synthetisches Virus - aus kondensierter Nukleinsäure umhüllt von proteinhaltigen Hülllipiden – aufgebaut ist.

Das System der künstlichen Virushüllen hat den Vorteil, dass das Targeting nicht an die kationische Verbindung zur Nukleinsäurekondensation gebunden ist, sondern unabhängig von der Nukleinsäurekondensation ein Targeting der Zellen mittels Targetorliposomen erfolgen kann.

Einem ähnlichen Aufbauprinzip folgen die *LPD-I* (= cationic liposome-entrapped, polycation-condensed DNA) und *LPD-II* (anionic liposome-entrapped, polycation-condensed DNA). Durch Zugabe von DC-Chol zu Protamin- oder Polylysin-kondensierter DNA wurden kompaktere Strukturen mit einer erhöhten Transfektionseffizienz erhalten, die auch in Serum stabil sind [103]. Fraktionen mit höherem Anteil kationischer Lipide sind in der Transfektion erfolgreicher als lipidarme Fraktionen [104]. Die aufgereinigten Komplexe werden als LPD-I bezeichnet. Protaminsulfat als kationisches Polymer führt zu einem noch effizienteren Gentransfersystem [96], welches als „novel LPD-I“ bezeichnet wird [103]. LPD-II besteht aus PLL-kondensierter DNA, die in eine pH-sensitive Liposomenformulierung aus DOPE, CHEMS und Folat-PEG-DOPE eingekapselt ist

[105], wobei die Transfektionseffizienz der Formulierungen LPD-I und LPD-II gegenüber DC-Chol-Liposomen um das 20 – 30fache bei verringerter Toxizität gesteigert werden konnte.

Durch die Kombination von PEI-kondensierter Plasmid-DNA mit kationischen Lipiden (DOTAP / DOPC / Gc) bzw. Neutralliposomen (DOPC / DOPS / Gc) oder negativen Liposomen (DOPS / DOPC) konnte die Transfektionseffizienz, gemessen als CAT-Expression, gegenüber der Applikation von PEI/DNA-Komplexen ohne Targetingprinzip signifikant gesteigert werden, wobei bei konstanter Menge der kationischen und neutralen Formulierung die CAT-Expression durch Erhöhung der PEI/Plasmid-Komplexmenge gesteigert werden kann [106].

1.3.5 Kombinationen von Transfektionsmethoden

Kombination von biologischen mit chemischen Transfektionsmethoden

Die Kombination von viralen mit chemischen Transfektionsmethoden kann zu einer vielfachen Verstärkung der Reportergenaktivität führen.

Durch Fusion von *kationischen Liposomen* aus TMAG (N-(α -trimethylammoniumacetyl)-didocyl-D-glutamatchlorid) und Cholesterol mit dem hämagglutinierenden Virus aus Japan (HVJ) ist die Reportergenaktivität in der Lunge nach inhalativer Applikation nachgewiesen worden, während ohne HVJ keine Reportergenaktivität detektierbar war [107]. Durch Einklonieren der AAV-Sequenz in ein pCMV-IL2-Plasmid wurde die Effizienz des DDAB/DOPE-Trägersystems so verbessert, dass eine zehnfach erhöhte IL-2-Menge nachweisbar war [108]. Durch Kombination von PEI/Plasmid-DNA-Komplexen mit replikationsdefekten Adenoviren-DNA (PEI-adenofektion) konnte die Transfektionseffizienz um das 140 - 300fache gesteigert werden [109].

Durch die Kombination von Viren mit kationischen Lipiden oder Polymeren konnte gezeigt werden, dass die Effektivität des Gentransfers der chemischen Trägersysteme erhöht werden kann. Die zelluläre Aufnahme wird durch rezeptorvermittelte Aufnahme gefördert. Der Nachteil ist, dass dieses System immunogen sein kann. Allerdings geht auf Kosten der optimierten Genexpression der Vorteil der chemischen Trägersysteme, nämlich die Nichtimmunogenität und Mehrfachapplizierbarkeit, verloren. Da ein viruskodierendes Plasmid ohne die Anwesenheit von freien Viren ebenfalls zu einer erhöhten Genexpression führt, ist die erhöhte Effizienz nicht alleine durch eine optimierte Aufnahme zu erklären. Die molekularen Ursachen der erhöhten Transfektionseffizienz müssen noch untersucht werden.

1.4 Mechanismen des Transports und der Freisetzung in der Zelle

Bis zum biologisch aktiven Peptid oder Protein müssen zahlreiche Hürden überwunden werden (s. Abbildung 1-10):

- Eintritt der komplexierten DNA in das Zytosol durch
 - Membranfusion [62],
 - Endozytose [110, 111],
 - Membranruptur
 - Freisetzung aus dem Endosom
- Eintritt in den Zellkern
- Transkription der DNA
- Translation der RNA in biologisch aktives Protein
- Nachweis eines biologischen Effekts

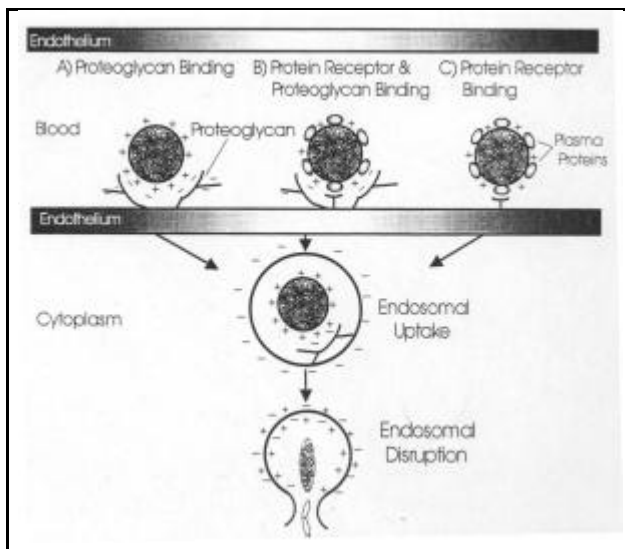


Abbildung 1-11: Schematische Darstellung der möglichen Bindungsschemata für CL-DNA-Komplexe nach systemischer Administration (aus [90])

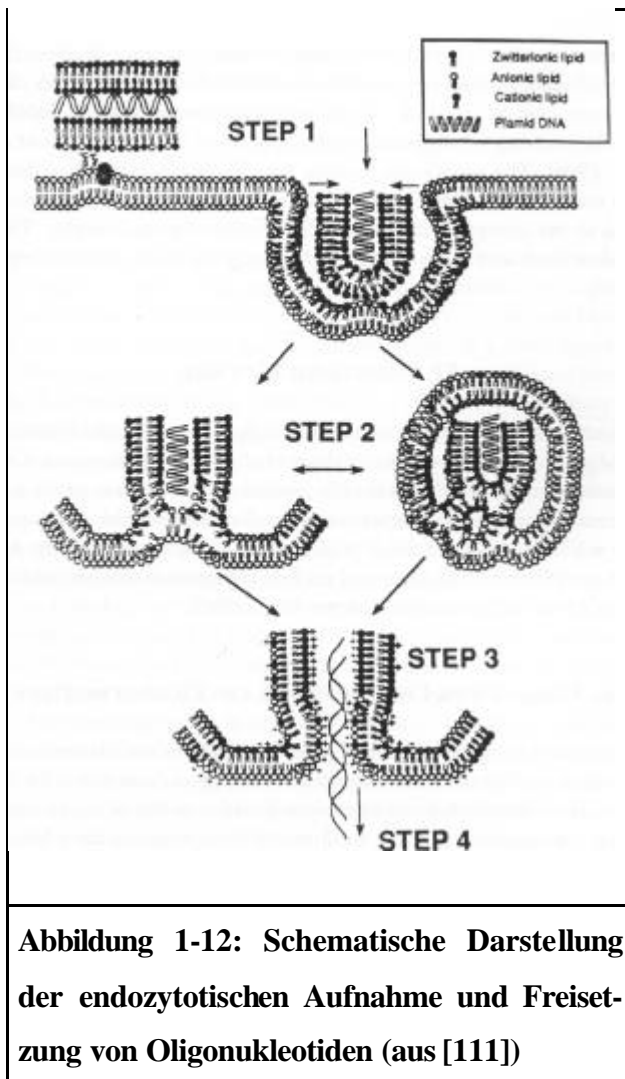
Für Plasmid-DNA ist eine Bindung der Komplexe mit kationischen Lipiden [112] oder Polymeren (Lipopolyamin; [113]) an anionische Proteoglycane der Zelloberfläche beschrieben worden (Abbildung 1-11).

Es hat sich bei zahlreichen Studien gezeigt, dass die endozytische Aufnahme der wichtigste Aufnahmemechanismus sowohl für Plasmid-DNA als auch für Oligonukleotide ist.

Es wird sowohl für Oligonukleotide als auch für Plasmid-DNA ein ähnlicher Aufnahme- und Freisetzungsmechanismus diskutiert, der hier am Beispiel der Oligonukleotidaufnahme und –freisetzung dargestellt werden soll [114] (s. Abbildung 1-12). Im Schritt 1 erfolgt endozytische Aufnahme des CL-ON-Komplexes. Der Komplex destabilisiert die endosomale Membran, was zu einem flip-flop anionischer Lipide führt (Schritt 2), welche in den Komplex diffundieren und ein geladenes Ionenpaar mit den kationischen Lipiden bilden, so dass das genetische Material aus dem

Endosom freigesetzt wird. In Schritt 3 erfolgt die Freisetzung des genetischen Materials in das Cytoplasma. In Schritt 4 erfolgt die Freisetzung des genetischen Materials in den Zellkern. In Schritt 5 erfolgt die Transkription der DNA in mRNA. In Schritt 6 erfolgt die Translation der mRNA in Protein. In Schritt 7 erfolgt die Freisetzung des Proteins in das Blut.

Komplex mit dem kationischen Lipid freigesetzt werden (Schritt 3), um anschließend in das Zytosol zu gelangen (Schritt 4).



Endosomolytische Agentien können die Freisetzung aus dem Endosom fördern, um zu verhindern, dass nach der Fusion des späten Endosoms mit Golgi-Vesikeln zum Lysosom enzymatischer Abbau der DNA vor der Freisetzung in das Zytosol erfolgt. Das Helferlipid DOPE, welches die liposomale Membran kationischer Liposomen stabilisiert, durchläuft bei Acidifizierung des Endosoms einen Wechsel von der hexagonalen Phase in die L_{α} -Phase mit der Folge der Zerstörung der endosomalen Membran und Freisetzung der DNA in das Zytosol [115].

1.5 Kondensation von Nukleinsäuren

Wie bereits unter 1.2.1 beschrieben, sind Nukleinsäuren als makromolekulare und negativ geladene Substanzen nicht in der Lage, die Membranen von Zellen zu überwinden. Unter **Kondensation** wird das Verknäulen von Nukleinsäuren in eine kompakte, kolloidale Form verstanden. Dieses geschieht unter gleichzeitiger Neutralisation der negativen Ladungen der Phosphatgruppen mit den bereits beschriebenen kationischen Verbindungen (siehe auch [116]).

Die Messung der Kondensation von Nukleinsäuren erfolgt durch

- Messung der Komplexgröße mit PCS oder EM
- Gel-shift-assay [117]
- Fluoreszenzspektroskopie [117]

Durch **PCS** wird ein Maß für die Größe der Komplexe gewonnen. Da die Kugelform nicht für alle Komplexe angenommen werden kann, muß davon ausgegangen werden, dass durch die Abweichung der Komplexe von der Kugelform sich gewisse Meßfehler ergeben, so dass keine absolute Größenangabe für die Komplexe erhalten werden kann. Durch elektronenmikroskopische oder rasterkraftmikroskopische Untersuchungen kann eine Aussage über die Komplexform erhoben werden.

Bei einem **Gel-shift-Assay** wird die mit einer kationischen Verbindung komplexierte Nukleinsäure in die Geltasche eines Agarosegels eingebracht. Ist die Nukleinsäure durch die kationische Verbindung kondensiert, so erfolgt keine Wanderung der Nukleinsäure im Gel nach Anlegen eines elektrischen Feldes. Ist die Nukleinsäure nicht stabil im Komplex gebunden, so ist eine Bande im Gel in einer bestimmten Entfernung vom Startpunkt nachweisbar. Nachteilig ist hier, dass die Messung in einem isotonen Elektrophoresepuffer erfolgt. Ist der Komplex in diesem Puffer (meistens TAE-, TBE- oder TPE-Puffer) nicht stabil, dann kann keine Aussage über die Kondensation des Komplexes gemacht werden. Weiterhin muß der Komplex auch gegenüber der angelegten Spannung stabil sein. Die Nukleinsäure hat das Bestreben zur Anode zu wandern, während die kondensierende Verbindung das Bestreben hat, zur Kathode zu wandern. Zahlreiche Studien zeigen aber, dass durch den Gel-shift-assay die Kondensation von Nukleinsäurekomplexen bestimmt werden kann. In einer Erweiterung des Assays ist es dann noch möglich, die Stabilität der komplexierten Nukleinsäure gegenüber DNAsen oder Serum zu testen, indem die Komplexe diesen Agentien ausgesetzt werden und dann die Wanderung der evtl. freigesetzten DNA im Gel untersucht wird.

Bei der **fluoreszenzspektroskopischen Kondensationsmessung** wird ein fluoreszierender Nukleinsäurekomplexe gebildet, indem die Nukleinsäure mit einer Verbindung, die sich in die Helix der Nukleinsäure einlagert, versetzt wird. Durch Zugabe von kationischen Verbindungen wird die Nukleinsäure kondensiert, so dass der Farbstoff aus der Helix der Nukleinsäure freigesetzt wird bzw. die Struktur der Nukleinsäurehelix so verändert wird, dass keine wirksame Energieübertragung zur Anregung der Elektronen im Farbstoffmolekül durch das eingestrahlte Excitationslicht mehr erfolgen kann. Die Folge ist eine Abnahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge der kationischen Verbindung. Vorteil der fluoreszenzspektroskopischen Kondensationsmessung ist die Möglichkeit, in gepufferten Lösungen zu arbeiten, ohne dass die Komplexe mit Fremdmedien in Berührung kommen.

Der Begriff der **Kondensation** wird in dieser Arbeit im Zusammenhang mit der fluorimetrischen Messung des Farbstoffausschlusses („dye exclusion“) von Nukleinsäuren gebraucht. Vorgänge, bei denen die Fluoreszenzintensität von kovalent oder physikalisch markierten Nukleinsäuren

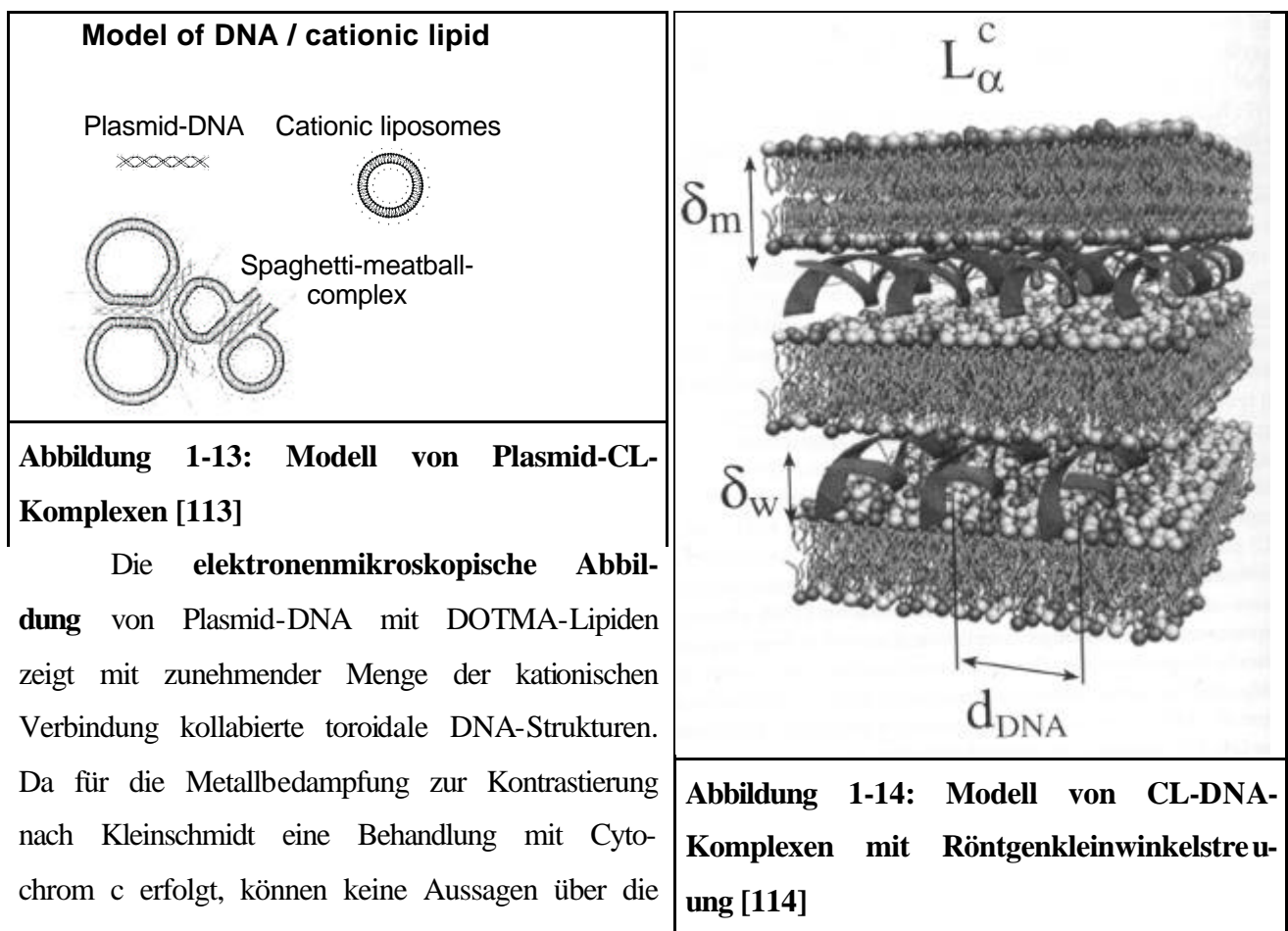
durch die Zugabe von kationischen Verbindungen vermindert wird, werden als Kondensation bezeichnet.

1.6 Modelle von Komplexen

Durch die fluorimetrische oder gelelektrophoretische Kondensationsmessungen können keine Aussagen über die Struktur von kondensierten Nukleinsäuren gewonnen werden. Um Informationen über die Struktur von Nukleinsäurekomplexen zu erhalten, werden

- elektronenmikroskopische Methoden
- Rasterkraftmikroskopie sowie
- Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

angewandt.



Durch Gefrierbruchelektronenmikroskopie konnte für Kondensate kationischer Lipide (DC-Chol-DOPE) mit Plasmid-DNA Strukturen, die als Spaghetti-Meatball-Komplexe bezeichnet wer-

den [119], dargestellt werden. Das Auftreten verschiedener Populationen strukturierter DNA-Komplexe konnte vielfach durch die Elektronenmikroskopie bestätigt werden [120], wobei die „spaghettiähnliche Struktur“ der für eine erfolgreiche Transfektion [121] wirksame Teil sein könnte [122] (Abbildung 1-13).

Durch Röntgenkleinwinkelstreuung konnte gezeigt werden, dass die DNA sich in multilamellaren Schichten zwischen den Lipidbilayern der kationischen Lipide befindet [123] (Abbildung 1-14).

1.7 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war es

- **biophysikalische Untersuchungsmethoden** zur Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen verschiedenen DNA-Arten und verschiedenen kationischen Trägersystemen zu entwickeln,
- mit Hilfe der biophysikalischen Untersuchungsmethoden die Wechselwirkung verschiedener DNA-Arten und den untersuchten kationischen Trägersystemen vergleichend zu charakterisieren sowie
- in **Zellkulturexperimenten** die Bedeutung dieser Wechselwirkungen darzustellen,
- mit Hilfe von Daten der biophysikalischen Untersuchungsmethoden ein Transfektionssystem am Beispiel von **RNA:DNA-Hybridoligonukleotiden** für die Transfektion von Zellen zu etablieren und zu optimieren.

Therapeutisches Ziel war hier die Entwicklung eines Transfektionssystems auf Basis von RNA:DNA-Hybridoligonukleotiden zur Konversion der Punktmutation bei Tyrosinose Typ I-Erkrankungen sowie des Faktor-IX-Mangels. Faktor IX-Mangel wurde als Krankheitsmodell gewählt, weil im Tiermodell der biologische Effekt durch Bestimmung des Gerinnungsstatus einfach bestimmt werden kann. Durch die Therapie der Tyrosinose I-Erkrankung mittels Genkonversion kann den bisher nur symptomatisch behandelbaren Patienten eine Kausaltherapie zukommen. Da eine ca. 10 %ige Restenzymaktivität für die Verstoffwechselung des Tyrosins ausreichend ist, können bereits geringe Transfektionsraten zu einem ausreichenden Enzymspiegel führen, um die Stoffwechselentgleisung zu korrigieren. Der Nachweis erfolgte molekularbiologisch durch DNA-Isolierung, Restriktion, PCR-Amplifizierung und Fragmentanalyse.

Als biophysikalische Untersuchungsmethoden wurden Fluoreszenzspektroskopie, Photonenkorrelationsspektroskopie, Transmissionselektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie verwendet.

- Die Kondensation wurde mit **Fluoreszenzspektroskopie** gemessen. Nach Auswahl des optimalen Farbstoffs und Puffersystems zur Fluoreszenzmarkierung von Nukleinsäuren wurde ein Assay für die Messung der kinetischen Stabilität von komplexierten Nukleinsäuren entwickelt. Um die zahlreichen Parameter, die die DNA-Kondensation beeinflussen, charakterisieren zu können, wurde eine Methode zur Messung von Titrationskurven für Nukleinsäuren mit kationischen Verbindungen (Liposomen, Proteine, Polymere) entwickelt und für die Optimierung von Gentherapiesystemen sowie zur Qualitätskontrolle von genetischem Material und den Trägersystemen verwendet.
- Die Größe und Stabilität von Liposomen wurde mit **Photonenkorrelationsspektroskopie** untersucht. Neben der Qualitätskontrolle der i.d.R. durch Extrusion durch Nuclepore-Membranen im Minimaßstab (1 ml) hergestellten Liposomendispersionen erfolgte eine Untersuchung des Quellungsverhaltens in verschiedenen Puffermedien. Es konnten Aussagen über
 - die Stabilität von Liposomen in den Medien zur Komplexierung der DNA und
 - Stabilität in Gegenwart von Medien zur Transfektion erhalten werden.
- **Transmissionselektronenmikroskopie** und **Rasterkraftmikroskopie** wurden zur Visualisierung von Nukleinsäurekomplexen verwendet. Es wurden verschiedene Methoden zur Messung von Nukleinsäurekomplexen mit Rasterkraftmikroskopie entwickelt und vergleichende Messungen in Luft und der Lösungsmittelzelle durchgeführt.
- Für eine erfolgreiche Genkonversion ist Zellkerntransport des Oligonukleotids erforderlich. Die Untersuchung der intrazellulären Verteilung von fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuren erfolgte durch **konfokale Laserscanningmikroskopie**.

Materialien und Methoden

2 Materialien

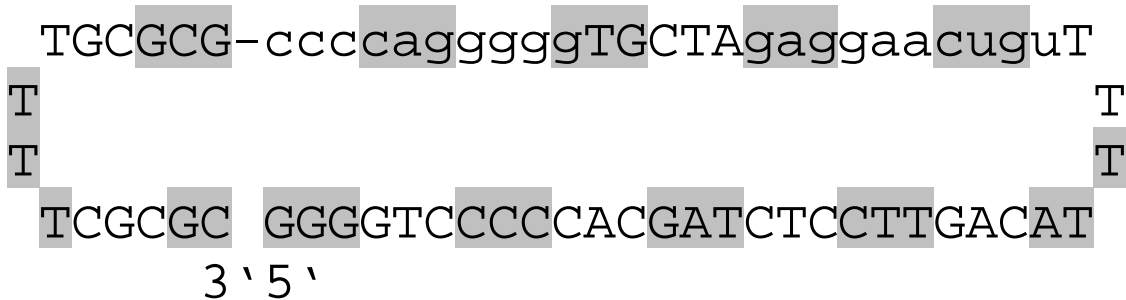
2.1 Nukleinsäuren

Die verwendeten Nukleinsäuren können nach der Anzahl der Basen, aus denen ein Nukleinsäurestrang besteht, eingeteilt werden in

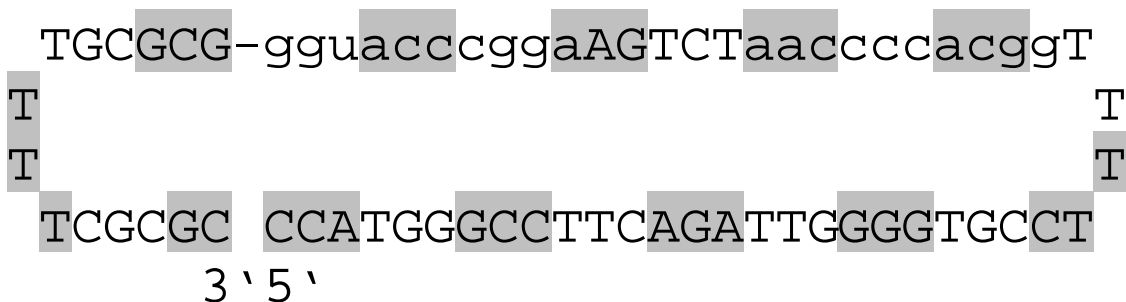
- Genomische DNA
- Plasmid-DNA
- Oligonukleotide
 - o "klassische" Oligonukleotide = DNA-Oligonukleotide = DNA-oligo
 - o DNA:DNA-Analoga der RNA:DNA-Hybridoligonukleotide = DNA:DNA-oligo
 - o RNA:DNA-Hybridoligonukleotide = RNA:DNA-Oligo = Chimeraplast

Die Basensequenzen der verwendeten DNA:DNA-Oligonukleotide bzw. RNA:DNA-Oligonukleotiden sind in Abbildung 2-1 dargestellt. In der Abbildung 2-2 sind wichtige Kenngrößen für die verwendeten Nukleinsäuren zusammengefasst. Alle DNA-Proben sind -falls nichts anderes beschrieben ist- bei - 20°C gelagert worden. Während der Versuchsdurchführung erfolgte die Lagerung bei 4 °C.

Faktor IX-RNA:DNA-Hybridoligonucleotid



Tyrosinose520-RNA:DNA-Hybridoligonucleotid



Tyrosinose520-DNA:DNA-Oligonucleotid

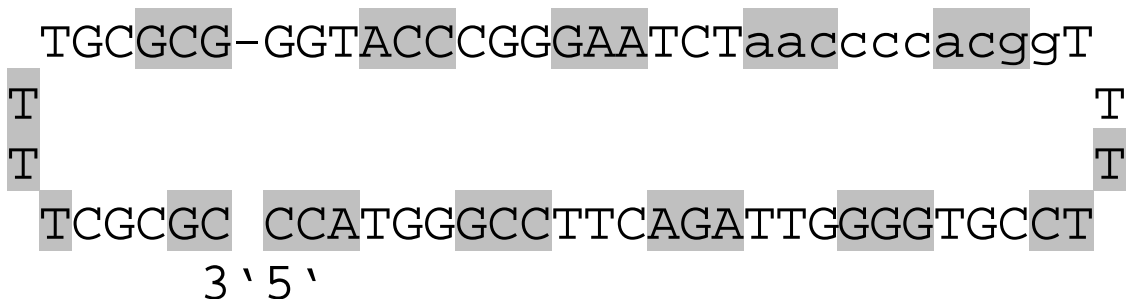


Abbildung 2-1: Basensequenzen von DNA:DNA-Oligonukleotiden und RNA:DNA-Hybridoligonukleotiden. Große Buchstaben kennzeichnen DNA-Basen. 2'-O-methylierte RNA-Basen werden durch kleine Buchstaben gekennzeichnet. Bei den RNA:DNA-Hybridoligonukleotiden werden 5 zentrale DNA-Basen beiderseits von 10 2'-O-methylierten RNA-Basen flankiert. Über ein 4 T-loop und eine Basenkomposition, die eine komplementäre Basenpaarung ermöglicht, wird ein intramolekularer Doppelstrang gebildet. Ein CGCGC-clamp am 3'-Ende des Moleküls stabilisiert das Hybridoligonukleotid und schützt vor enzymatischem Abbau.

Probe	Quelle	Basen	M _{DNA} [g/mol]	M _{fDNA} [g/mol]	Charge
Genomische DNA					
Kalbsthymus-DNA - Standard	Sigma / Pharmacia-Biotech	100000	3,3 * 10 ⁷	-	1
					2
λ-DNA - Standard	Molecular Probes	k. A.	k. A.	-	1
Plasmid-DNA					
pCMVlacZ	s. 3.1.1	13600	4,5 * 10 ⁶	-	1
pGFP	S. Brüsselbach (IMT, Marburg)			-	1
Plasmid HS	H. Schreier (H. Schreier Consulting, Sebastopol, CA, USA)			-	1
Oligonukleotide					
DNA:DNA-Oligonukleotid					
f _{FAM} -DNA:DNA-1	MWG-Biotech	68	2,0914 * 10 ⁴	2,1452 * 10 ⁴	1
f _{FAM} -DNA:DNA-2					2
f _{FAM} -DNA:DNA-3					3
f _{FITC} -DNA:DNA-4	Roth				4
f _{Cy5} -DNA:DNA-5	MWG-Biotech			2,0847 * 10 ⁴	5
DNA:DNA-1				-	1
DNA:DNA-2					2
DNA-Oligonukleotid					
MM-DNA	Brüsselbach (IMT, Marburg)	20	5,953 * 10 ³	-	1
f _{Cy3} -MM-DNA			5,953 * 10 ³	6,719 * 10 ³	1
RNA:DNA-Oligonukleotid					
RNA:DNA(Ty)-1	Perkin-Elmer Applied Biosystems	68	2,12 * 10 ⁴	-	1
RNA:DNA(Ty)-2					2
RNA:DNA(IX)-1					1
RNA:DNA(IX)-2					2
RNA:DNA(IX)-3					3
Abbildung 2-2: Überblick über die verwendeten Nukleinsäuren. f = Fluoreszenzmarkierung; RNA:DNA = Hybridoligonukleotid; DNA:DNA = DNA-Analogon der RNA:DNA-Hybridoligonukleotide; DNA = einzelsträngiges Oligonukleotid					

Genomische DNA

Standard-DNA für fluorimetrische Gehaltsbestimmungen war von Pharmacia Biotech. Das Lyophilisat (250 µg) wurde in 1000 µl Wasser gelöst und bei 4 °C gelagert.

fDNA:DNA-Analoga der RNA:DNA-Hybridoligonukleotide

Die Chargen 1-3 der DNA:DNA-Analoga der RNA:DNA-Hybridoligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersbach) synthetisiert. Charge 4 wurde von Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe) synthetisiert.

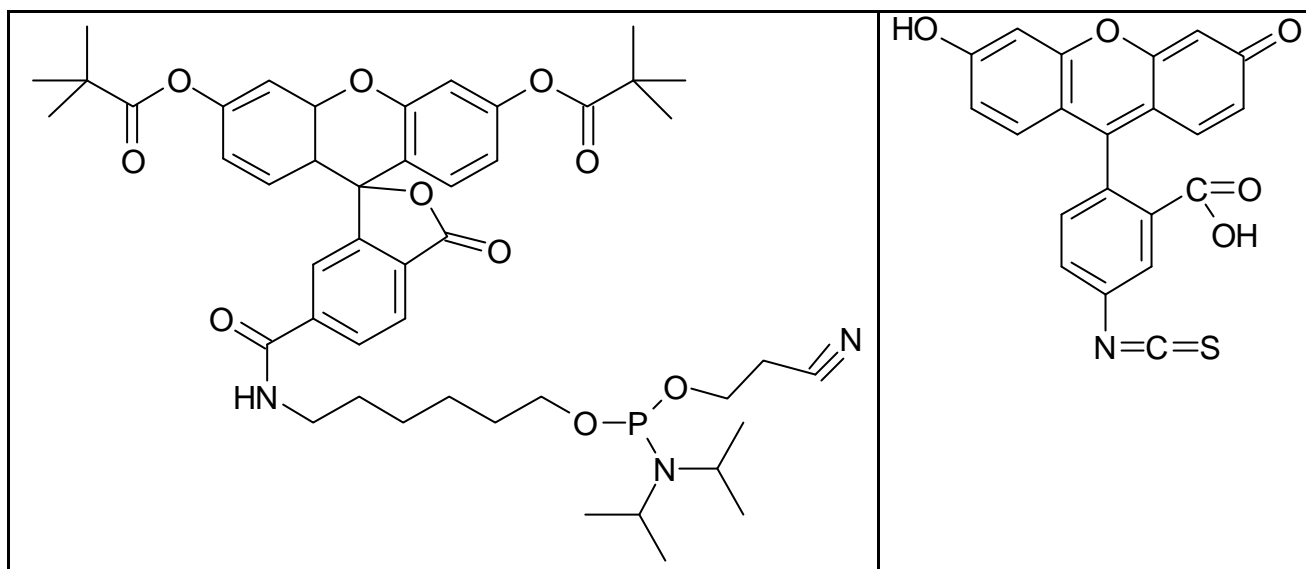


Abbildung 2-4: 6-FAM als Amidit mit Schutzgruppen (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und FITC (dargestellt als 5-Isomer) zum kovalenten Fluoreszenzmarkieren von DNA:DNA-Oligonukleotiden

Die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide der Chargen 1 - 3 wurden als wäßrige Lösungen geliefert in einem Finalvolumen von 200 µl. Nichtmarkierte Oligonukleotide und f_{FITC}DNA:DNA-4 wurden lyophilisiert geliefert und wurden in frischem bidestilliertem Wasser oder Reinstwasser gelöst. Es ist eine photometrische Gehaltsbestimmung der Oligonukleotide (s. 5.1) in T-Puffer durchgeführt worden.

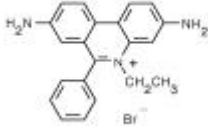
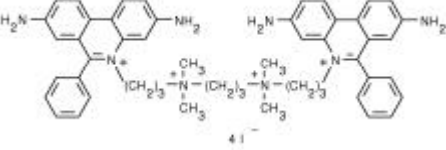
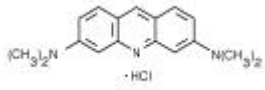
RNA:DNA-Hybridoligonukleotide

Die Hybridoligonukleotide wurden von Perkin Elmer Applied Biosystems (Weiterstadt) bezogen, hergestellt von Kimeragen (Newtown, PA, USA). Die RNA:DNA-Hybridoligonukleotide wurden als lyophilisierte Zubereitungen geliefert. Das Lyophilisat wurde mit 1000 µl frischem bidestilliertem Wasser versetzt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gemischt, anschließend zu 100 µl aliquotiert. Das Lyophilisat enthält nach Angaben der Herstellerfirma 10 OD RNA:DNA-Hybridoligonukleotide. RNA:DNA(IX)-2 ist mit 12 OD deklariert. Die Lagerung erfolgt bei - 20 °C. Die Proben werden maximal 5 Auftau- und Einfrierzyklen unterzogen. Eine UV-photometrische Gehaltsbestimmung wurde durchgeführt.

2.2 DNA-Farbstoffe

Die verwendeten Farbstoffe (s. Tabelle 2-1 und Tabelle 2-2) lassen sich einteilen in

- Phenanthridine
 - Ethidiumbromid (EB)
 - Ethidium-Homodimer-2 (EthH-2)
- Acridin-Derivate
 - Acridinorange (AO)
- Cyanin-Farbstoffe
 - monomere Cyanin-Farbstoffe = TO-PRO-Serie
 - "1-Serien"
 - "3-Serien"
 - dimere Cyanin-Farbstoffe = TOTO-Serie
 - "1-Serien"
 - "3-Serien"
 - "Green"-Farbstoffe
 - PicoGreen™
 - OliGreen™
 - RiboGreen™

Ethidiumbromid	
Ethidiumhomodimer-2	
Acridinorange	
Tabelle 2-1: Strukturformeln der Phenanthridin-Farbstoffe (EB, EthH-2) und des Acridin-Farbstoffs AO	

Ethidiumbromid (Serva, Heidelberg) und Acridinorange (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) wurden als wäßrige Lösung der Farbstoffe erhalten. Ethidiumhomodimer, die Farbstoffe der Cyanin-Reihen, und die Farbstoffe der Green-Reihe (alle Molecular Probes, Eugene, OR, USA) sind Lösungen in DMSO. Die DMSO-gelösten Farbstoffe werden bei

-20 °C gelagert und vor der Anwendung 2-3 Stunden auf Raumtemperatur erwärmt. Die Lagerung der wäßrigen Farbstofflösungen erfolgte bei 4 °C.

Bei den Substanzen unbekannter chemischer Struktur ("Green"-Farbstoffe) ist in 4 ml-Makroküvetten für 2 ml DNA-Lösung 5 µl der Farbstofflösung zur fluorimetrischen Gehaltsbestimmung (s. 5.2) verwendet worden. Im 96-well-Mikroplattenassay ist für Kinetikmessungen (s. 7.2 - 7.4) pro Näpfchen 0,75 µl, für inkrementelle Kondensationsmessungen (s. 8) pro Näpfchen 0,25 µl der jeweiligen DMSO-Lösung des Fluoreszenzfarbstoffs verwendet worden. Zur Herstellung der NA-Farbstoff-Komplexe wurde die gesamte NA-Menge für Messungen mit NA gleicher Art und Menge in dem entsprechenden Puffer verdünnt. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde zupipettiert und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren bis zum Erhalten einer homogenen Lösung (visuelle Sichtkontrolle) gemischt. Nach zehnminütiger Inkubation sind die NA-Farbstoffkomplexe entsprechend auf die Platten aufgetragen worden.

2.3 Lipide und Liposomen

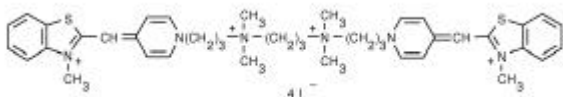
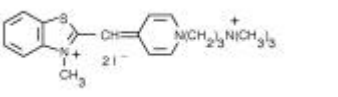
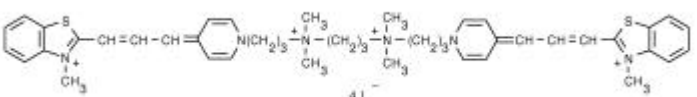
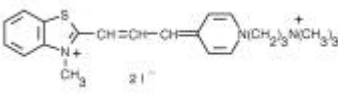
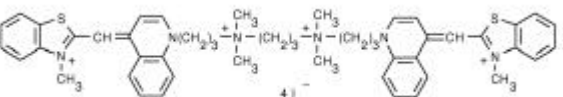
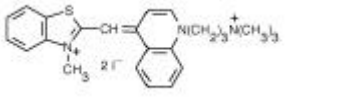
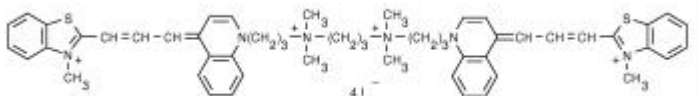
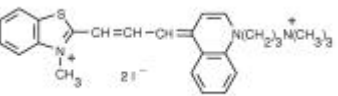
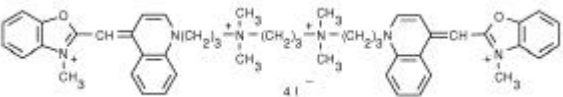
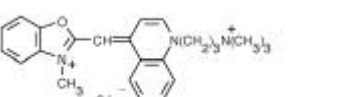
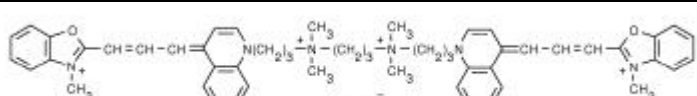
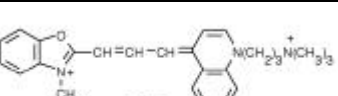
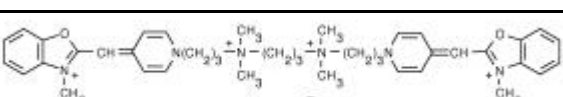
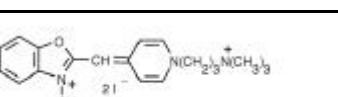
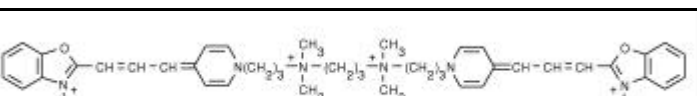
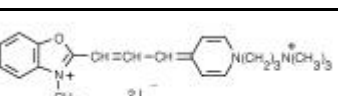
Die verwendeten Lipide werden bei - 20 °C als feste Reinsubstanz oder in chloroformigen Stammlösungen gelagert. Zur Herstellung der Lipidstammlösungen wird das Lipid nach zweistündigem Auftauen in einen 2 ml Messkolben eingewogen und mit Chloroform auf 2 ml aufgefüllt. Die Stammlösungen werden in HPLC-Vials mit Teflonverschluß (WGA, Düsseldorf) und Abdichten mit Parafilm bei -20 °C gelagert. In Tabelle 2-3 sind die verwendeten Lipide zusammengefasst.

2.4 Kationische Proteine und Polymere

Protaminsulfat mit USP-Qualität von EliLilly & Co. (Indianapolis, IN, USA) wurde von H. Schreier (H. Schreier Consulting, Sebastopol, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Die Konzentration der Stammlösung betrug 10 mg/ml, gelöst in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung.

PEI 25 kDa (50 % w/w-Lösung in Wasser) war von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Nr. 40,872-7). Die wäßrige Polymerlösung wurde in isotonischer Kochsalzlösung gelöst und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt.

Die folgende Tabelle 2-4 gibt einen Überblick über die Verwendung der einzelnen Substanzen für die Versuche:

BOBO-1		BO-PRO-1	
BOBO-3		BO-PRO-3	
TOTO-1		TO-PRO-1	
TOTO-3		TO-PRO-3	
YOYO-1		YO-PRO-1	
YOYO-3		YO-PRO-3	
POPO-1		PO-PRO-1	
POPO-3		PO-PRO-3	
Tabelle 2-2: Strukturformeln von Cyanin-Farbstoffen			

EiPC	Lipoid KG, Ludwigshafen
DOTAP	Avanti Polar Lipids, Ottawa, CAN
DOPE	
DOPS	
DLPE	Sygena LTD, Liestal, Schweiz
Cholesterol	Calbiochem Corp., La Jolla, CA, USA
NBD-PE	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Rh-DOPE	
DMTAP	U. Massing, Klinik für Tumorbilogie, Freiburg
DSTAP	
Tabelle 2-3: Übersicht der verwendeten Lipide	

	TEM (s. 9)	AFM (s. 9)	FL-Kond. (s. 7 - 8)	CLSM (s. 10)	DNA-Isolierung (s. 11.1)	BrdU (s. 11.2)
Protaminsulfat	X	X	X	X	X	X
PEI 25 kDa			X		X	X
Tabelle 2-4: Verwendung kationischer Kondensationsreagentien für Versuche zur Charakterisierung der Wechselwirkung mit Nukleinsäuren						

	TEM (s. 9)	AFM (s. 9)	Fluoreszenzkinetik (s. 7)	inkrementelle Fluoreszenzkon-densation (s. 8)
pCMVlacZ	X	X	X	X
GFP				X
Plasmid HS	X	X		
Tabelle 2-5: Verwendung von Plasmiden für Versuche zur Charakterisierung der Wechselwirkung mit kationischen Kondensationsreagentien				

NA	inkrementelle Fluoreszenzkon- densation (s. 8)	CLSM (s. 10)	BrdU (s. 11.2)	DNA- Isolierung (s. 11.1)
f _{FAM} DNA-DNA – Ch. 1	X			
f _{FAM} DNA-DNA – Ch. 2	X			
f _{FAM} DNA-DNA – Ch. 3	X	X		
f _{FITC} DNA-DNA – Ch. 4	X	X		
f _{Cy5} DNA-DNA – Ch- 5	X			
DNA:DNA – Ch. 1	X			
DNA-DNA – Ch. 2	X		X	X
RNA:DNA (Ty) – Ch. 1	X			
RNA:DNA (Ty) – Ch. 2	X			
RNA:DNA (Ty) – Ch. 3	X			
RNA:DNA (IX) – Ch. 1	X			
RNA:DNA (IX) – Ch. 2	X			

Tabelle 2-6: Verwendung von oligomeren Nukleinsäuren für Versuche zur Charakterisierung der Wechselwirkung mit kationischen Kondensationsreagentien

2.5 Bakterienkulturen, Zellkulturmedien und –substrate

2.5.1 Bakterienkulturmedium

LB-Medium

10 g Bacto-Trypton (DIFCO), 5 g Hefeextrakt (Yeast Extract Servabacter, Serva, Heidelberg) und 10 g Natriumchlorid (Serva, Heidelberg) werden in 1000 ml Wasser gelöst. Das Medium wird autoklaviert (10 min., 121 °C). Nach Abkühlung auf ca. 40 °C wird das Antibiotikum Ampicillin (800 µl 50 mg/ml) zugesetzt.

LB-Agar

10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g Natriumchlorid sowie 15 g BactoAgar werden zu 1000 ml in destilliertem Wasser gelöst. Das Medium wird autoklaviert und auf 50 °C abkühlen

gelassen, anschließend das Antibiotikum zugesetzt. Nach Verfestigung des Agars werden die Platten bei 4 °C gelagert.

2.5.2 Zellkulturmedien

Die 1. Charge HepG2-Zellen wuchs in Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle's Salts ohne L-Glutamine (Life Technologies GmbH, Karlsruhe), welches mit FCS, Glutamin und sterilfiltrierter, endotoxingetester Penicillin-Streptomycin Solution (Sigma-Aldrich Co. LTD, Irvine KA12 8NB, UK) versetzt war.

Die 2. Charge HepG2-Zellen wurde in RPMI-Medium (GIBCO) kultiviert.

2.5.3 Pufferlösungen und weitere Chemikalien

Zur Herstellung der Puffer wurden die Salze eingewogen, auf 80 % des Gesamtvolumens mit Reinstwasser aufgefüllt. Mit Salzsäure (36 %) oder Natronlauge wurde der pH-Wert auf 7,45 - 7,55 eingestellt, mit Reinstwasser auf das Sollvolumen (100 ml) aufgefüllt und erneut der pH-Wert gemessen. Die verwendeten Substanzen waren von analytischer oder synthetischer Qualität.

Puffer	Zusammensetzung
T-Puffer	10 mM Tris pH 7,5
TN-Puffer	Tris 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,5
P-Puffer	7,5 mM Phosphat pH 7,5 für inkrementelle Kondensationsmessungen (s. 8)
	20 mM Phosphat pH 7,5 (für TEM und AFM (s. 9) kinetische Fluoreszenz-messungen (s. 7)
PMg-Puffer	10 mM Phosphat, 2,5 mM MgCl ₂ , pH 7,5
TMg-Puffer	10 mM Tris, 2,5 mM MgCl ₂ , pH 7,5
PBS-Puffer	0,592 g Natriummonohydrogenphosphat-2H ₂ O 0,095 g Kaliumdihydrogenphosphat 4,0 g Natriumchlorid Aqua bidest. ad 500,0 ml
GTE-Puffer	50 mM Glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0
P1-Puffer	50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0
P2-Puffer	200 mM NaOH, 1 % SDS
P3-Puffer	3 M Kaliumacetat, Essigsäure, pH 5,5
Pseudo-QBT-Puffer	750 mM Natriumchlorid, 50 mM MOPS, pH 7,0
QBT-Puffer	150 mM Natriumchlorid, 50 mM MOPS, 15 % (V/V) Ethanol 96 %, 0,15 % Triton
QC-Puffer	1 M Natriumchlorid, 50 mM MOPS, 15 % (V/V) Ethanol 96 %
QF-Puffer	1,25 M Natriumchlorid, 50 mM Tris, 15 % (V/V) Ethanol 96 %, pH 7,5
Tabelle 2-7: Zusammensetzung der Puffer	

Substanz	Hersteller
Tris	Roth, Karlsruhe Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
MOPS	Serva, Heidelberg
Kaliumhydrogensulfat	Merck, Darmstadt
Tabelle 2-8: Substanzen	

Pufferlösungen und sämtliche Verdünnungen wurden mit Reinstwasser aus einer Anlage bestehend aus den Komponenten Seradest Vario, Seralpur BETA und Seralpur DELTA UV/UF, (Seral Reinstwasseranlagen, Ransbach) mit nachgeschaltetem Super[®] DCF[™] (Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA)-Sterilfilter (0,22 µm) hergestellt. Alle Lösungen werden nach der Herstellung bzw. vor der Verwendung durch 0,22 µm Membranfilter (Schleicher & Schüll, Dassel bzw. Millipore, Molsheim) filtriert. Die Herstellung von Liposomen mit kationischen Lipiden sowie das Lösen von lyophilisierten Oligonukleotiden erfolgt mit frisch zweifachdestilliertem Wasser (Fistreem water still 4 BD, Kleiner AG, Wohlen, Schweiz).

2.5.4 Anti-fading mounting medium

Das Einbettungsmedium für die CLSM-Untersuchungen ist folgendermaßen zusammengesetzt [124]

- 22 % PVA (Sigma, Deisenhofen)
- 11 % Glycerol
- 5 % DABCO (Sigma, Deisenhofen)
- 56 mM Tris-HCl pH 7,5 (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)

60 g 56 mM Tris pH 7,5 werden zum Sieden erhitzt. 22 g Polyvinylalkohol (Sigma, Deisenhofen) wird in Anteilen aufgestreut und unter Rühren bei 100 – 150 °C eingearbeitet. Die Heizplatte wird ausgestellt und das Gel unter leichtem Rühren erkalten gelassen. Das Gel läßt man über Nacht quellen. Am folgenden Tag wird mit Glycerol und Wasser auf die erforderliche Masse aufgefüllt, auf 120 – 150 °C erhitzt und DABCO unter Rühren eingearbeitet. Die Heizplatte wird ausgestellt und es wird bis zur vollständigen Homogenität Rühren gelassen. Zum Vertreiben von Luftblasen wird das Gel noch weiter gerührt, anschließend in Schnappdeckelgläschen aliquotiert und bei 4 °C gelagert. Zur Herstellung der Präparate wird das Gel auf der Heizplatte wieder aufgeschmolzen und ein Tropfen des verflüssigten Gels auf einen Objektträger gegeben und anschließend sofort das zellhaltige Deckgläschen umgekehrt auf den Objektträger gelegt.

3 Methoden

3.1 DNA-Methoden

3.1.1 Darstellung von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch säulenchromatographische Aufreinigung

Die Transformation der Bakterien erfolgt nach einer modifizierten Methode nach Chung et al. [125] mit dem Protokoll "Transformation von Plasmid-DNA" [126].

Die nach Chung et al. [125] mit MgCl_2 , PEG 3500 – 8000 und DMSO-haltigem Transformations- und Lagermedium kompetent (= für die Aufnahme von Plasmiden vorbereitet) gemachten Bakterien werden bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Zur **Transformation** werden 50 - 200 μl der auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien in eiskühlte Eppendorfgefäße aliquotiert. 1 bis 100 ng Plasmid-DNA werden den Zellen zugesetzt. Die Bakterien werden 5 - 15 min auf Eis inkubiert, dann 5 - 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann nochmals 5 - 15 min auf Eis inkubiert. Es wird mit antibiotikafreiem LB-Medium auf 1000 μl aufgefüllt, anschließend auf einem Eppendorf-Schüttler bei 600 rpm und $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. 100 μl Zellsuspension werden auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

Zur **Kultivierung** der Bakterien werden 5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einer Kolonie der Platte angeimpft und dann 5 - 8 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 225 rpm inkubiert. 500 ml antibiotikahaltige Kulturlösung wird mit 5 ml der Vorkultur versetzt und über Nacht bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 150 bis 300 rpm inkubiert. Folgekulturen werden durch Überimpfen eines Aliquots der Kulturlösung in antibiotikahaltiges LB-Medium überführt.

Das **Präparieren der Plasmid-DNA** erfolgt mit käuflichen Aufreinigungskits von Genomed und QIAGEN nach den Angaben des Herstellers, sofern nichts anderes angegeben ist. Die Präparierung der DNA erfolgt im Maxi-Maßstab aus 500 ml Kulturmedium, im Giga-Maßstab aus 3000 ml Kulturlösung.

Zur mehrfachen Säulennutzung der QIAGEN-Säulen wird die Säule mit 75 ml QBC-Equilibration-Puffer equilibriert. Die pelletierten Bakterien (10 min, $20\text{ }^\circ\text{C}$, 2200 rpm, Beckman-

Zentrifuge mit Rotor für 500 ml-Gefäße) werden im Zentrifugenbehälter mit 30 ml (6 x 5 ml) GTE-Lösung resuspendiert und anschließend der Inhalt der 6 Zentrifugenbehälter in einen Zentrifugenbehälter zusammengeführt. Die Lyse erfolgt mit 60 ml Buffer P2 (Lysis Buffer) und 10 Minuten Inkubation bei RT. Der Ansatz wird mit 50 ml Buffer P3 (Neutralisationspuffer), der auf 4 °C vorgekühlt worden ist, neutralisiert, 10 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (10 min.; 4°C; 15000 g), anschließend durch dampfsterilisierte Kaffeefilter filtriert. Das Volumen des Eluats wird bestimmt und durch Zugabe von 0,5 VT Isopropanol die DNA gefällt. Der Ansatz wird zur Fällung 10 min stehengelassen und in 6 Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Nach dem Zentrifugieren (4°C; 30 min; > 15000 g; 12200 rpm) wird der überstehende Isopropanol vorsichtig dekantiert, mit 2 ml Ethanol 70 % gewaschen, anschließend bis 6000 rpm hochzentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert.

Für die *modifizierte Eluierung* wird die Säule mit Buffer QBT (Equilibration Buffer) equilibriert, das Bakterienpellet in 6 x 2 ml GTE-Puffer aufgenommen und der Inhalt der einzelnen Zentrifugenröhrchen zusammengeführt. 3 ml Buffer P1 mit RNase zugeben (Verdünnung: 1 : 5 auf 20 µg / ml RNase A) und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, dann auf 90 ml mit Pseudo-QBT-Puffer aufgefüllt. Die Lösung wird auf die Säule gegeben, der Durchlauf gesammelt und auf Eis gestellt. Die Säule wird mit 400 ml Buffer QC (Wash Buffer) gewaschen, dannach die Plasmid-DNA mit 75 ml Buffer QF (Elution Buffer) eluiert. Das Plasmid wird wie oben beschrieben gefällt.

Nach erneutem Equilibrieren der Säule kann der auf Eis gestellte Durchfluß nochmals über die Säule gegeben werden, um die im vorherigen Durchlauf nicht gebundene Plasmid-DNA zu eluieren.

Das luftgetrocknete Pellet wird in TE-Puffer aufgenommen und der Gehalt UV-photometrisch bestimmt.

3.1.2 Gehaltsbestimmung von DNA

Photometrische Gehaltsbestimmung

Die photometrische Gehaltsbestimmung von DNA beruht auf spezifischen Extinktionskoeffizienten für die einzelnen Nukleotidbasen.

Nukleinsäure	Umrechnungsfaktor
ds-DNA	50 µg / OD
ss-DNA	30 µg / OD
RNA-DNA-Hybridoligonukleotid	33 µg / OD
RNA	40 µg / OD

Tabelle 3-1: Umrechnungsfaktoren für photometrische DNA-Gehaltsbestimmung. Plasmid-DNA wird mit dem Umrechnungsfaktor für ds-DNA berechnet, DNA- und DNA:DNA-Oligonukleotiden werden mit dem Umrechnungsfaktor für ss-DNA berechnet.

1,00 – 2,00 µl Lösung der Nukleinsäure wurde nach Durchmischen durch Auf- und Abpipettieren in eine 70 µl-Quarzglasküvette (Hellma, Mühlheim-Baden) pipettiert. Es wurde mit T-Puffer genau auf 70 - 75 µl aufgefüllt und die OD mit einem Eppendorf-

Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Die Umrechnung der gemessenen OD in die Konzentration erfolgte mit den in Tabelle 3-1 aufgeführten Umrechnungsfaktoren.

Fluoreszenzspektroskopische Gehaltsbestimmung

Die fluoreszenzspektroskopische Bestimmung des DNA-Gehalts erfolgte mit PicoGreen™ (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), einem Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch in doppelsträngiger DNA interkaliert. In eine 4 ml Plastikfluoreszenzküvette werden 1995 µl der Nukleinsäurelösung eingefüllt, mit 5 µl PicoGreen™-Reagenz versetzt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gemischt. Die DNA-PicoGreen™-Komplexe werden 10 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschliessend die Fluoreszenz gemessen mit einer Anregungswellenlänge von 492,5 nm und einer Emissionswellenlänge von 518 nm. Der Anregungsspalt wird auf eine Spaltbreite von 2,5 nm eingestellt und der Breite des Emissionsspalt so angepasst, dass die Extinktion für die am höchsten konzentrierten Proben > 500 Fluoreszenzeinheiten beträgt. Es wird eine Eichgerade mit λ-Phagen-DNA-Standard (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) aufgezeichnet und der Gehalt der Nukleinsäure aus der Eichgeraden abgelesen bzw. aus der Regressionsfunktion berechnet.

3.2 Liposomen

AVE™

Die Lipide werden in Chloroform gelöst und in einen 100 ml Rundkolben pipettiert. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum abrotiert, bei fluoreszenzmarkierten Liposomen unter Lichtschutz. Der Film wird $\frac{1}{4}$ h im Vakuumtrockenschrank nachgetrocknet, in Puffer ohne Glaskugeln aufgenommen und $\frac{3}{4}$ h am Rotationsverdampfer (Rotavapor M, Büchi Flavor, Schweiz) bei Normaldruck rolliert. Die erhaltene Liposomendispersion wird mindestens 2 h ruhen gelassen. Die multilamellaren Vesikel werden vor der eigentlichen Extrusion durch eine Behandlung mit Ultraschall vorzerkleinert. Die erhaltene Dispersion von multilamellaren oder oligolamellaren Vesikeln wird dann durch 50 nm-Nuclepore-Membranen extrudiert. Die Ultraschallbehandlung erfolgt entweder mit der Ultraschallspitze durch 5maliges Eintauchen der Ultraschallspitze unter Eiskühlung in die Liposomensuspension oder durch zweiminütiges Beschallen im Ultraschallwasserbad (Branson 2200, Branson, Danbury, USA) unter Resonanzbedingungen. Titanreste in der mit der Ultraschallspitze behandelten Probe werden durch Abzentrifugieren (2 x 5 Minuten, 14000 rpm mit Rotor für 18 Reaktionsgefäße, Eppendorf 5418-Zentrifuge, Eppendorf, Hamburg), und dekantieren des Überstands entfernt. Nach mindestens zweistündigem Ruhen werden die Liposomen 21 mal durch 50 nm-Nucleporemembranen (Avestin, Ottawa, CAN) mit einem LiposoFast™-Miniextruder (Avestin, Ottawa, CAN) extrudiert.

Liposomen aus kationischen Lipiden

DOTAP bzw. DOTAP / DOPE-Liposomen werden durch Hydratisieren des Lipidfilms in zweifach destilliertem Wasser (Fistrem water still 4 BD, Kleiner AG, Wohlen, Schweiz) hergestellt. Es werden 2 – 15 mg Lipide verwendet. Die multilamellaren Vesikel werden nach Ruhen 21 mal durch Nucleporemembranen extrudiert und die Größe in Reinstwasser vermessen.

3.3 Größencharakterisierung kolloider Systeme durch Photonenkorrelations-spektroskopie (PCS)

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) bzw. dynamische Lichtstreuung („dynamic light scattering“ = DLS) ist ein optisches Verfahren zum Charakterisieren von Größe und Verteilung kolloider Systeme.

50 – 100 µl Liposomen wurden auf 300 – 400 µl mit dem jeweiligen Puffer verdünnt. Die Größen wurden mit einem Zetasizer 4 (Malvern Instruments, Herrenberg) mit zylindrischen PCS-Küvetten vermessen. Die Messdauer betrug bei Einzelmessungen 10 – 15 Minuten. Für kinetische Stabilitätsuntersuchungen wird eine Messdauer von 120 Sekunden eingestellt. Der Korrelator mit 64 Kanälen wurde im „serial mode“ betrieben. Die „sample time“ wurde manuell eingestellt. Als Richtwert wurde die "sample time" auf den erwarteten Durchmesser (in nm) * 0.5 µs/nm eingestellt und manuell so nachreguliert, dass die Autokorrelationsfunktion über den 64 Kanälen des Korrelators exponentiell abfällt. Für die Auswertung wurden die Messergebnisse der Kanäle 2 - 64 herangezogen. Die Länge eines Unterlaufs betrug ca. 20 Sekunden. Eine Messung von 120 Sekunden bestand aus 10 Unterläufen. Bei Verlängerung der Messzeit wurden entsprechend mehr Unterläufe gemessen. Die Auswertesoftware verwendete nur die am besten geeigneten Unterläufe zur Auswertung. Die Zählrate betrug mindestens 4 Kcounts / s und überschritt nicht 50 Kcounts /s. Die Auswertung erfolgte mit multimodaler Analyse. Es wurden die Daten der Kanäle 2 bis 64 für die Auswertungen herangezogen. Der Zetasizer wurde mit der PCS-Software Version 1.26 (Malvern Instruments, Herrenberg) gesteuert.

3.4 Fluoreszenzspektroskopische Methoden

Für die Fluoreszenzspektroskopie wird ein Perkin Elmer LS50B Fluoreszenzspektrophotometer (Perkin Elmer, Überlingen) verwendet. Das mit einer gepulsten Xenon-Lampe betriebene Gerät ist mit einem Plattenleser ausgestattet. Die Steuerung von Photometer und Plattenleser erfolgt über FLWinLab 2.01-Software (Perkin Elmer, Überlingen). Die Fluoreszenzmessungen werden mit weißen unbeschichteten 96-well-Platten von Perkin-Elmer (Überlingen) für die Messung der Kon-

densationskinetik (s. 7.) bzw. CorningCostar (Bodenheim) für die inkrementelle Kondensationsmessung (s. 8.) durchgeführt. Messungen in der Küvette werden mit physikalisch-fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuren mit 4 ml Kunststoffküvetten (Sarstedt AG, Sevelen, Schweiz) durchgeführt. Andere Fluoreszenzmessungen werden mit 4 ml oder 0,5 ml Quarzglasküvetten (Hellma, Mühlheim/Baden) durchgeführt. Die maximal messbare Fluoreszenzintensität beträgt 1000 Einheiten.

3.4.1 Spektren von Thymus-DNA mit interkalierenden Farbstoffen

Kalbsthymus-DNA wurde auf eine Endkonzentration von 250 ng/ml verdünnt. Die Messungen wurden in 4 ml Fluoreszenz-Kunststoffküvetten durchgeführt, die zu 2,5 ml gefüllt wurden. Die DNA-Menge betrug 625 ng, äquivalent zu 0,757 nmol Basenpaaren.

350 µl einer Stammlösung von Kalbsthymus-DNA der Konzentration 1,786 µg/ml wurden in die Küvette pipettiert und anschließend auf 2,5 ml aufgefüllt.

Die Farbstoffe wurden im molaren Verhältnis von 1 : 50 , berechnet auf Basenpaare, zugesetzt. Die Ausgangskonzentration der Farbstoffe betrug 1 mmol/l. Zunächst wurden die Farbstoffe 1 : 100 verdünnt auf eine Konzentration von 10 µmol/l. 1.89 µl der 10 µM-Farbstofflösung müssen zugesetzt werden, um ein Verhältnis von 1 : 50 (bp) zu erhalten.

Nach Farbstoffzugabe wurde ca. 5 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend wurden die Spektren aufgezeichnet. Die Inkubationsdauer variiert dadurch, dass bis zur Einstellung der optimalen Wellenlängen unterschiedlich lange Vormessungen notwendig waren.

3.4.2 Messung der DNA-Kondensationskinetik

Durchführung

Es wurde eine Nukleinsäure-Verdünnung so hergestellt, dass in 149,25 µl Nukleinsäureverdünnung 200 ng Nukleinsäure gelöst waren. Zu dieser Nukleinsäurearbeitslösung wurden 0,75 µl PicoGreen™-Reagenz oder eine entsprechende Menge des angegebenen Fluoreszenzfarbstoffes gegeben und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren sowie mildes vortexen bis zur Homogenität gemischt. Üblicherweise wurden 10 ml der Nukleinsäureverdünnung hergestellt, wobei die entsprechende Farbstoffmenge zur gesamten DNA-Menge zupipettiert wurde unter anschließendem inten-

sivem Mischen durch Vortexen oder Pipettenmischen. Die Lösung wurde 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Abnehmen eines Aliquots darf die Lösung nicht mehr durchmischt werden.

Es wurden 150 µl der farbstoffhaltigen Nukleinsäureverdünnung in die Näpfcchen A1 – H8 einer 96-well-Platte pipettiert (**Platte A = Messplatte**). Desweiteren werden in die Näpfcchen A9 – H12 150 µl des verwendeten Puffers pipettiert (Tabelle 3-2). Anschließend erfolgt die Messung des Nukleinsäure- und Pufferausgangswerts, indem die Platte A = Messplatte dreimal vermessen wird. Die Integrationszeit beträgt 1,0 Sekunde pro Näpfcchen.

Während die Platte vermessen wird, wird eine Verdünnung der kationischen Verbindungen auf der **Platte B = Verdünnungsplatte** zur Nukleinsäurekondensation hergestellt. Es werden zwei verschiedene kationische Verbindungen auf einer Platte als Vierfachbestimmung vermessen. Es wird eine Verdünnung der kationischen Verbindungen so hergestellt, dass die erforderliche Menge der kationischen Verbindung in 50 µl der Pufferlösung gelöst ist.

Auf der Platte B wird dann eine Verdünnungsreihe der entsprechenden kationischen Verbindungen pipettiert. Die Berechnung erfolgt mit dem Datenblatt „Kinetikkondensation.xls“ (s.u.).

- Es werden in die Näpfcchen A1-G4 der Platte B 70 µl der entsprechenden Verdünnung (50 µl enthalten die notwendige Menge der kationischen Verbindung) der ersten kationischen Verbindung pipettiert,
- in die Näpfcchen A5 – G8 werden 70 µl der entsprechenden Verdünnungsreihe für die zweite kationische Verbindung pipettiert,
- in die Näpfcchen H1 – H8 (DNA-Kontrolle) und A9 – H12 werden jeweils 70 µl der verwendeten Pufferlösung pipettiert (Tabelle 3-3).

Anschließend werden 50 µl der Verdünnungen der kondensierenden Agentien bzw. die entsprechenden Pufferlösungen mit einer Zwölfkanalpipette von der Verdünnungsplatte B auf die Platte mit den nukleinsäurehaltigen Lösungen A übertragen. Es wird in der Zeile H begonnen. Die Verdünnungen werden nochmals durch Auf- und Abpipettieren gemischt und dann auf die nukleinsäurehaltige Platte unter kräftiger Scherung übertragen. Die Komplexe werden durch kräftiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Ohne Wechsel der Pipettenspitzen wird entsprechend der zunehmenden Konzentration der kationischen Verbindungen von Reihe G bis Reihe A analog gemischt und übertragen. Es werden die Zeiten vom Beginn der Pipettierung in Reihe H, Ende der Pipettierung in Reihe A und Beginn der fluorimetrischen Kondensationsmessung aufgezeichnet und diese Zeiten anschließend in das Datenblatt zur Auswertung eingetragen. Die Meßplatte wird 300mal mit einer Integrationszeit von 1,0 Sekunden vermessen. Die Gesamtmeßdauer beträgt ca. 15 Stunden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	P	P	P	P
B	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	P	P	P	P
C	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	P	P	P	P
D	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	P	P	P	P
E	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	P	P	P	P
F	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	P	P	P	P
G	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	P	P	P	P
H	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	P	P	P	P

Tabelle 3-2: Belegung der Platte A mit Nukleinsäure (NA) und Puffer (P). Es werden in jedes Nöpfchen 150 µl der farbstoffhaltigen Nukleinsäurearbeitslösung bzw. Pufferlösung pipettiert und die Platte dreimal vermessen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K1-1	K1-1	K1-1	K1-1	K2-1	K2-1	K2-1	K2-1	P	P	P	P
B	K1-2	K1-2	K1-2	K1-2	K2-2	K2-2	K2-2	K2-2	P	P	P	P
C	K1-3	K1-3	K1-3	K1-3	K2-3	K2-3	K2-3	K2-3	P	P	P	P
D	K1-4	K1-4	K1-4	K1-4	K2-4	K2-4	K2-4	K2-4	P	P	P	P
E	K1-5	K1-5	K1-5	K1-5	K2-5	K2-5	K2-5	K2-5	P	P	P	P
F	K1-6	K1-6	K1-6	K1-6	K2-6	K2-6	K2-6	K2-6	P	P	P	P
G	K1-7	K1-7	K1-7	K1-7	K2-7	K2-7	K2-7	K2-7	P	P	P	P
H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

Tabelle 3-3: Belegung der Platte B mit den Verdünnungen der kationischen kondensierenden Verbindungen K1 und K2 mit jeweils 7 verschiedenen Konzentrationen, abnehmend von 1 bis 7. In die mit P gekennzeichneten Nöpfchen werden 70 µl des Puffers eingefüllt. Es werden 70 µl in jedes Nöpfchen pipettiert. Davon werden nach Durchmischung 50 µl auf die Platte A übertragen.

Auswertung

Die Auswertung der fluorimetrischen Kondensationsmessung erfolgt nach folgenden mathematischen Beziehungen:

$RI_{bleach}^{t=x} = \frac{\frac{INT_{DNA}^{t=x,200} - INT_{Puffer}^{t=x,200}}{INT_{DNA}^{t=x,200} - INT_{Puffer}^{t=x,200}}}{\frac{INT_{DNA}^{t=0,200} - INT_{Puffer}^{t=0,200}}{INT_{DNA}^{t=0,200} - INT_{Puffer}^{t=0,200}}}$
Formel 3-1: Ausbleichen eines DNA-Farbstoff-Komplexes ($RI_{bleach}^{t=x}$)
$\overline{RI_{bleach}^{t=x}} = \frac{1}{n} \sum_1^n RI_{bleach}^{t=x}$
Formel 3-2: Mittleres Ausbleichen ($RI_{bleach}^{t=x}$) von DNA-Farbstoff-Komplexen (n = 8)
$RI_{kond}^{t=x} = \frac{\frac{INT_{DNA+Kond}^{t=x,200} - INT_{Puffer}^{t=x,200}}{(INT_{DNA+Kond}^{t=0;150} - INT_{Puffer}^{t=0;150}) * VK_{DNA}}}{\frac{INT_{DNA}^{t=x,200} - INT_{Puffer}^{t=x,200}}{(INT_{DNA}^{t=0;150} - INT_{Puffer}^{t=0;150}) * VK_{DNA}}}$
Formel 3-3: Formel zur Berechnung der DNA-Kondensation in einem Nöpfchen für x = 1 – 300
$INT_{DNA+Kond}^{t=0,200} = (INT_{DNA+Kond}^{t=0,150} - INT_{Puffer}^{0,150}) * VK_{DNA} + INT_{Puffer}^{0,150} * VK_{Puffer}$
Formel 3-4: Formel zum Extrapolieren des Startwertes für DNA für Kondensationsmessungen von 150 µl auf 200 µl
$VK_{DNA} = \frac{\frac{INT_{DNA}^{t=0;200} - INT_{Puffer}^{t=0;200}}{INT_{DNA}^{t=0;150} - INT_{Puffer}^{t=0;150}}}{\frac{INT_{DNA}^{t=0;150} - INT_{Puffer}^{t=0;150}}{INT_{DNA}^{t=0;150} - INT_{Puffer}^{t=0;150}}}$
Formel 3-5: Volumenkorrekturfaktor der DNA zur Berechnung der Kondensation von Nukleinsäuren (s. Formel 3-3 und Formel 3-4)
$VK_{Puffer} = \frac{\frac{INT_{Puffer}^{t=0;200}}{INT_{Puffer}^{t=0;150}}}{\frac{INT_{Puffer}^{t=0;150}}{INT_{Puffer}^{t=0;150}}}$
Formel 3-6: Volumenkorrekturfaktor des Puffers zur Berechnung der Kondensation von Nukleinsäuren (s. Formel 3-4)

Symbol	Beschreibung	Anzahl der Nöpfchen	Messung	Nöpfchen
$INT_{DNA+Kond}^{t=x,200}$	Kondensation zum Zeitpunkt $t = x$	1	$x = 1 - 300$	A1 – G8
$\overline{INT_{DNA+Kond}^{t=0;150}}$	DNA-Kontrolle zum Zeitpunkt $t = 0$ in 150 μ l DNA-Lösung in den Nöpfchen, die für die Kondensation verwendet werden	3 x 1		
$\overline{\overline{INT_{DNA}^{t=0;150}}}$	Mittelwert der DNA-Kontrollwerte zum Zeitpunkt $t = 0$ in 150 μ l Lösung	3 x 8		H1 – H8
$INT_{DNA}^{t=0;200}$	DNA-Kontrollwert zum Zeitpunkt $t = 0$	1		
$INT_{DNA}^{t=x,200}$	DNA-Kontrollwert zum Zeitpunkt $t = x$	1	$x = 1 - 300$	
$\overline{INT_{DNA}^{t=x,200}}$	Mittelwert der DNA-Kontrollwerte zum Zeitpunkt $t = x$	8	$x = 1 - 300$	
$\overline{\overline{INT_{Puffer}^{t=0;150}}}$	Mittelwert der Puffermessungen zum Zeitpunkt $t = 0$ in 150 μ l Puffer	3 x 32		A9 – H12
$\overline{\overline{INT_{Puffer}^{t=x,200}}}$	Mittelwert der Puffermessungen zum Zeitpunkt $t = x$	32	$x = 1 - 300$	

Tabelle 3-4: Legende zu den Formeln zur Berechnung der Kondensation von Nukleinsäuren. Nomenklatur: $\overline{\overline{A}}$: Mittelwert der Mehrfachmessung mehrerer Nöpfchen, \overline{A} : Mittelwert der Mehrfachmessung eines Nöpfchens oder Mittelwert der Einfachmessung mehrerer Nöpfchen, A : Einfachmessung eines Nöpfchens

Computerunterstützte Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem Auswerteprogramm „Kondensationskinetik.xls“. (Microsoft Excel 97 und 2000). Die dargestellten Formeln sind in dieses Programm eingearbeitet. Es erfolgt automatisierte Auswertung, wenn die beschriebene Plattenbelegung angewendet wird.

3.4.3 Messung der DNA-Kondensation durch inkrementelle Kondensationsmessung

Bei der inkrementellen Kondensationsmessung wird die Änderung der Fluoreszenzintensität innerhalb eines Nöpfchens bei Zugabe der kationischen Verbindung in kleinen Schritten verfolgt. Die DNA wird also nicht durch die einmalige Zugabe der gesamten Menge der kationischen Verbindung kondensiert, sondern es erfolgt eine Kondensation in Einzelschritten durch Zugabe der kationischen Verbindung i. d. R. in Schritten von 0,2 (+/-) Ladungsverhältnissen.

Der Versuch wird in drei Schritten durchgeführt

1. Pufferwert
2. DNA-Leerwert
3. Kondensationsmessung

Puffer

Zunächst wird in jedes Nöpfchen der 96 well-Platte 95 µl Puffer-Lösung pipettiert (Tabelle

Probe	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]
dsDNA mit Pi-coGreen™	492,5	518
RNA:DNA mit Oli-Green™	485	516
Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide	493	515
Tabelle 3-5: Absorptionsmaxima von Pi-coGreen™-dsDNA und OliGreen™-ssDNA-Komplexen sowie fluoreszenzmarkierten FAM-Oligonukleotiden.		

3-7). Dabei muß innerhalb einer Spalte immer der gleiche Puffer verwendet werden, so dass maximal 12 verschiedene Puffer bei einer Messung verglichen werden können. Die Platte wird mit einem Wellenlängenprogramm gescannt, wobei in jedem Nöpfchen bei 20 verschiedenen Spaltbreiten die Intensität gemessen wird. Es wird üblicherweise das Setup der Tabelle 3-5 verwendet:

Wurden verschiedene Nukleinsäuren, die in der Nähe der "FITC-Wellenlängen" (480 nm / 520

nm) das Absorptions- und Emissionsmaximum aufweisen, analysiert, so wurde mit diesen Messeinstellungen die Kondensation vermessen.

DNA-Leerwert

Es wird in die Reihen B bis H jeweils 5 µl fluoreszierende Nukleinsäureverdünnung pipettiert. Innerhalb einer Spalte muß sich in jedem Nöpfchen die gleiche Nukleinsäure nach Art und Menge befinden. In die Reihe A werden 5 µl Puffer pipettiert (Tabelle 3-7). Es wird die Intensität mit der entsprechenden DNA-Methode (Tabelle 3-3) gemessen und die optimale Meßmethode durch Auswahl einer geeigneten Spaltbreite (Intensität zwischen 600 und 800) herausgearbeitet.

Kondensationsmessung

Bei der eigentlichen Kondensationsmessung wird in die Reihen A (Puffer) und B (Nukleinsäurekontrolle) jeweils 1 oder 2 µl Reinstwasser zupipettiert, um das Volumen bei Kontrollmessungen an das Volumen bei den Kondensationsexperimenten anzugleichen. Durch Zupipettieren von 2 µl werden die Verdunstungsverluste während der Messung ausgeglichen, so dass das Volumen innerhalb eines Nöpfchens konstant gehalten werden kann.

In den Reihen C bis H kann jeweils eine kationische Verbindung zum Kondensieren der Nukleinsäure zugegeben werden (Tabelle 3-8). Beim Versuchsdesign ist es ratsam den Versuch so anzulegen, dass innerhalb einer Zeile immer die gleiche kondensierende Verbindung zugesetzt wird. Wird die DNA-Menge in den einzelnen Näpfchen konstant gehalten, so reicht eine Lösung für eine Zeile aus. Werden Mehrfachbestimmungen durchgeführt, so werden diese untereinander, also in verschiedene Zeilen pipettiert. Es sollten nicht mehr wie 4 verschiedene Konzentrationen der Nukleinsäure eingesetzt werden, weil für jede Nukleinsäurekonzentration jeweils eine Arbeitslösung hergestellt werden muß.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
B	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
D	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
E	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
F	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
G	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
H	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12

Tabelle 3-6: Belegung der Platte bei der Bestimmung des Pufferwertes. Es werden 95 µl Puffer auf die Platte pipettiert. Es kann für jede Spalte ein anderes Puffersystem verwendet werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
B	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
C	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
F	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
G	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
H	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12

Tabelle 3-7: Belegung der Platte bei der Bestimmung des DNA-Leerwertes. Es werden 5 µl DNA-Arbeitslösung in die entsprechenden Näpfchen pipettiert. Es kann für jede Spalte eine andere Nukleinsäure verwendet werden. In die Reihe A werden 5 µl Wasser pipettiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
B	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
C	K1a	K2a	K3a	K4a	K5a	K6a	K7a	K8a	K9a	K10a	K11a	K12a
D	K1b	K2b	K3b	K4b	K5b	K6b	K7b	K8b	K9b	K10b	K11b	K12b
E	K1c	K2c	K3c	K4c	K5c	K6c	K7c	K8c	K9c	K10c	K11c	K12c
F	K1d	K2d	K3d	K4d	K5d	K6d	K7d	K8d	K9d	K10d	K11d	K12d
G	K1e	K2e	K3e	K4e	K5e	K6e	K7e	K8e	K9e	K10e	K11e	K12e
H	K1f	K2f	K3f	K4f	K5f	K6f	K7f	K8f	K9f	K10f	K11f	K12f

Tabelle 3-8: Belegung der Platte bei der Kondensationsmessung. In den Spalten A und B werden bei jedem Durchgang 2 µl Wasser pipettiert, in die Reihen C bis H jeweils 2 µl der Verdünnung der kondensierenden Verbindung a – f eingebracht.

$RI^n = \frac{\frac{INT_{DNA+Kond}^n - INT_{Puffer\eta_{DNA+Kond}}^n}{INT_{DNA+Kond}^0 - INT_{Puffer\eta_{DNA+Kond}}^0}}{\frac{INT_{DNA}^n - INT_{Puffer\eta_{DNA}}^n}{INT_{DNA}^0 - INT_{Puffer\eta_{DNA}}^0}}$	
Formel 3-7: Formel zur Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität RI^n für die inkrementelle Nukleinsäurekondensation	
$RI_{bleach}^n = \frac{INT_{DNA}^n - INT_{Puffer\eta_{DNA}}^n}{INT_{DNA}^0 - INT_{Puffer}^0}$	
Formel 3-8: Formel zur Berechnung des Ausbleichens von Nukleinsäuren und Nukleinsäurefarbstoffkomplexen (RI_{bleach}^n) für die inkrementelle Nukleinsäurekondensation	
$INT_{Puffer\eta_{DNA+Kond}}^n = \frac{INT_{Puffer\eta_{DNA+Kond}}^0}{INT_{Puffer\eta_{Puffer}}^0} * INT_{Puffer\eta_{Puffer}}^n$	$INT_{Puffer\eta_{DNA}}^n = \frac{INT_{Puffer\eta_{DNA}}^0}{INT_{Puffer\eta_{Puffer}}^0} * INT_{Puffer\eta_{Puffer}}^n$
Formel 3-9: Formel zum Extrapolieren des Pufferwertes für kondensierte Nukleinsäuren und Nukleinsäurekontrollen	

t = 0 (Platte A)	Messung n (Platte B)	Beschreibung	Lokalisation
$INT_{Puffer_{Puffer}}^0$	$INT_{Puffer_{Puffer}}^n$	Intensität des Puffers	Reihe A
$INT_{Puffer_{DNA}}^0$	$INT_{Puffer_{DNA}}^n$ (e)		Reihe B
$INT_{Puffer_{DNA+Kond}}^0$	$INT_{Puffer_{DNA+Kond}}^n$ (e)		Reihe C - H
INT_{DNA}^0	INT_{DNA}^n	Intensität der DNA-Kontrolle	Reihe B
$INT_{DNA+Kond}^0$	$INT_{DNA+Kond}^n$	Intensität der Kondensationsmessung	Reihe C – H
Tabelle 3-9: Legende zu Formel 3-7 - Formel 3-9 zur inkrementellen Nukleinsäurekondensation. (e): extrapolierter Wert nach Formel 3-8 und Formel 3-9.			

Computerunterstützte Auswertung

Zur computerunterstützten Auswertung wurde eine auf VisualBasic (Office 97 und Office 2000, Microsoft GmbH, Unterschleissheim) basierende Auswerterroutine entwickelt, die im folgenden als FLKond bezeichnet wird. Das Programm übernimmt

- neben einer automatischen Beschriftung der Proben
- die automatische Berechnung der Kondensationsmessungen (DNA-Mengen und Ladungsverhältnisse) sowie
- die Übertragung der Meßdaten aus einzelnen Meßdateien in die den jeweiligen Messungen zugehörigen Auswertedatei, wobei in den Auswertedateien
 - die Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität RI^n von der zugesetzten kationischen Verbindung,
 - das Photobleaching (RI_{bleach}^n) als Funktion der Meßschritte (somit fortlaufenden Zeit) sowie
 - der Pufferkorrekturfaktor als Funktion der Meßschritte

angezeigt wird. Der Pufferkorrekturfaktor ist der Quotient $\frac{INT_{Puffer_{DNA+Kond}}^0}{INT_{Puffer_{Puffer}}^0}$ bzw. $\frac{INT_{Puffer_{DNA}}^0}{INT_{Puffer_{Puffer}}^0}$.

Die Berechnung erfolgt nach den in Formel 3-7 bis Formel 3-9 dargestellten Beziehungen.

3.5 Mikroskopische Methoden

3.5.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Untersuchungen wurden mit einem Zeiss EM 109 – Transmissionselektronenmikroskop (Oberkochen) durchgeführt. Es wurden 3 – 8 µl der präparierten Proben auf ein Kupfernetz gegeben und das gleiche Volumen eines Kontrastierungsmittels zugegeben. Elektrisch negativ und neutrale Proben wurden mit 4 % Phosphorwolframsäure (PWS) 80 Sekunden inkubiert, kationisch geladene Proben wurden mit 0,1 % Uranylformiat (UF) 3 Minuten inkubiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde abgesaugt und die Probe im Vakuum betrachtet. Zur Skalierung wird eine Eichmessung mit 50 nm Latexpartikeln durchgeführt.

3.5.2 Rasterkraftmikroskopie

Es wurde ein MultiMode™-Scanning Probe Mikroskop (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) verwendet mit einem E-Scanner mit dem NanoScope-IIIa-system controller. Die Abbildungen wurden auf frisch gespaltenem Glimmer aufgenommen. Für Messung in Luft wurde eine Silicium-Feder (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) mit einer großen Federkonstante eingesetzt. Die Feder wurde in der Nähe der Resonanzfrequenz des Federbalkens angeregt. Für Messungen im TappingMode™ in Lösung wurde die Lösungszelle (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) mit einer Siliciumnitrid-Feder (Si_3N_4) mit einer Federlänge von 100 µm (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) mit einer geringen Federkonstante ($< 1 \text{ N/m}$) eingesetzt. Für Phase-Imaging-Messungen wurde das Extender™ Electronics Module (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) verwendet.

Methode A: Vorlage der kationischen Verbindung mit anschließender Zugabe von DNA

5 µl der entsprechend verdünnten kationischen Verbindung wurden auf frisch gespaltenen Glimmer pipettiert. Nach Adsorption wurde der flüssige Überstand mit einem "Kimwipes"-Papier abgesogen und in strömendem Argon getrocknet, dann 5 µl der verdünnten DNA zugegeben und erneut inkubiert. Nach Absaugen des Überstands wurde im strömendem Argongas getrocknet.

Methode B: Inkubationsmethode

5 μ l der entsprechend verdünnten DNA-Arbeitslösung wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, anschließend wurden 5 μ l der entsprechend verdünnten kationischen Verbindung zugegeben und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gemischt. Von dem Reaktionsgemisch wurden 5 μ l auf Glimmer überführt und nach Abtupfen der überstehenden Flüssigkeit wurde im Argonstrom getrocknet.

Methode C: Zugabe von inkubierten Komplexen auf kationisierten Glimmer

Es wurden 5 μ l der entsprechend verdünnten Lösung der kationischen Formulierung auf frisch gespaltenen Glimmer pipettiert, der Überstand abgesaugt und im Argonstrom getrocknet. Die Komplexierung wurde analog Methode B durchgeführt. 5 μ l komplexierte DNA wurden auf die kationisierte Oberfläche pipettiert und nach Absaugen des Überstands wurde erneut im Argonstrom getrocknet.

Methode D: Abbildungen in der Flüssigkeitszelle

Die Liposomen wurden auf eine Konzentration von 0,02 mg/ml mit dem entsprechenden Puffer verdünnt. Es wurden 200 μ l in die Flüssigkeitszelle injiziert. Die DNA wurde in komplexierter Form oder als freie DNA injiziert wie bei den entsprechenden Abbildungen beschrieben. Nach zehnminütiger Inkubation wurde im TappingMode™ oder contact mode abgebildet. Berechnete Ladungsverhältnisse beziehen sich auf die in die Lösungsmittelzelle injizierte Menge. Durch Totvolumina bzw. Injektion eines Überschusses kann die wahre Konzentration auf dem Glimmer von der berechneten Menge der Liposomen oder DNA abweichen. Es wurden 200 μ l der auf 20 μ g/ml verdünnten Liposomen injiziert. Anschließend erfolgte Injektion von 200 μ l Plasmid-DNA oder komplexierter Plasmid-DNA. Überschüssige, aus der Lösungsmittelzelle austretende Lösung wurde mit einem Tuch abgesaugt.

3.5.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie wird unter 10 beschrieben.

3.6 Zellkultur

3.6.1 Zellkultur

Ziel der Versuche der Transfektion mit Oligonukleotiden und Hybridoligonukleotiden ist das nukleare Gentargeting von Leberzellen über den Asialoglykoproteinrezeptor. Daher wurden HepG2-Zellen für die Zellkulturversuche verwendet. Diese Zelllinie exprimiert diesen Rezeptor, an den Lactose oder Asialoglykoprotein binden können.

Es wurden 2 Chargen von HepG2-Zellen verwendet. Die Charge 1 war vom Institut für Virologie der Justus-Liebig Universität Giessen zur Verfügung gestellt worden und wurden bereits vielfach passagiert. Die 2. Charge HepG2-Zellen wurde vom DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) bezogen.

Die Zellen wurden ca. 1 Woche vor der Transfektion in 6-well-Platten (Corning Costar, Bodenheim) ausgesät. Für die Untersuchungen mit CLSM befindet sich in jedem Näpfchen ein Deckgläschen (25 x 25 mm²). Das Wachstum erfolgte unter Zusatz von Kollagen. Durch den Kollagenzusatz wachsen die Zellen auf den Deckgläschen an. Vor der Transfektion wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend wie im folgenden beschrieben transfiziert (s. 10.1). Es werden zwischen 10⁵ und 10⁶ Zellen für die Transfektionsexperimente und CLSM-Untersuchungen in 6-well-Platten eingesetzt.

Für die Toxizitätsuntersuchungen mit dem BrdU-Assay (s. 11.2) wurden die Zellen in 96-well-Platten (Corning Costar, Bodenheim) in einer Zellzahl von 10⁴ Zellen / Näpfchen mindestens einen Tag vor dem Versuch ausgesät.

3.6.2 Transfektion mit fDNA:DNA-Oligonukleotiden und nichtkationischen liposomalen Formulierungen für CLSM-Untersuchungen

Die Oligonukleotide werden so verdünnt, dass in 80 µl Oligonukleotidlösung 5 µg Oligonukleotide enthalten sind.

Die Protaminsulfat-Lösung wird so verdünnt, dass in 20 µl der Verdünnung die Protaminsulfatkonzentration dem deklarierten Ladungsverhältnis entspricht. 20 µl der Protaminverdünnung

werden zu 80 µl der Oligonukleotidverdünnung gegeben, durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gemischt und für eine ¾ Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Liposomen – entsprechend verdünnt, dass in 100 µl die deklarierte Menge enthalten ist – werden zupipettiert, durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gemischt und für ¼ h inkubiert. Die fertige Formulierung wird mit TN-Puffer auf 1500 µl verdünnt und auf die Zellen gegeben, anschließend im Brutschrank inkubiert.

Ist die Inkubationszeit größer 5 Stunden, wird nach 3 Stunden mit PBS gewaschen und HepG2-Medium zugesetzt. Die Zellen werden mit PBS gewaschen, anschließend wird die in TN-Puffer verdünnte Formulierung auf die Zellen gegeben und für den genannten Zeitraum inkubiert. Nach Waschen in PBS werden die Präparationen mit 250 µl PBS versetzt. Auf einen Objektträger werden ca. 30 µl Antifading-Mounting-Medium gegeben und das Deckgläschen umgekehrt auf den Objektträger gelegt.

3.6.3 Messung der Zellproliferation mit BrdU-Assay

DNA-DNA-Oligonukleotid (Ch. 2) wird mit TPuffer so verdünnt, dass in 72 µl der Arbeitslösung die entsprechende Menge DNA vorhanden ist (s. Auswertung). Die kationischen Substanzen zur DNA-Kondensation werden so verdünnt, dass in 18 µl die entsprechende DNA-Menge vorhanden ist. Die AVE™-3 werden so verdünnt, dass in 50 µl die entsprechende DNA-Menge vorhanden ist. Der Versuch wird folgendermaßen angelegt:

DNA:DNA – Ch. 2	AVE™-3 – Ch. 3	Kationische Trägersysteme	
m [ng]	m [ng]	charge ratio [+/-]	
		Protamin	PEI
5000	15000	10 / 5 / 3 / 1 / 0	10 / 5 / 3 / 1 / 0
500	1500	10 / 5 / 3 / 1 / 0	10 / 5 / 3 / 1 / 0
50	500	10 / 5 / 3 / 1 / 0	10 / 5 / 3 / 1 / 0
5	15	10 / 5 / 3 / 1 / 0	10 / 5 / 3 / 1 / 0

Tabelle 3-10: Versuchsdesign des BrdU-Assays zur Bestimmung der Zellproliferation nach Zusatz verschiedener Transfektionssysteme

72 µl Verdünnung der entsprechenden Oligonukleotidmenge werden mit 18 µl der kationischen Verbindungen komplexiert und 2-3 Stunden inkubiert. Anschließend wird mit 50 µl AVE™-3-Verdünnung, die die entsprechende Lipidmenge (s. Tabelle 3-10) enthält, oder 50 µl T-Puffer

versetzt. Nach ca. 1stündiger Inkubation wird mit 60 µl 3,3 X TN-Puffer versetzt, so dass 200 µl des Transfektionssystems erhalten werden. Die Transfektion wird sowohl mit AVE™-3 als auch ohne liposomales Hilfsreagenz durchgeführt.

Die in 96-well-Platten ausgesäten Zellen werden mit 200 µl PBS gewaschen und dann mit 200 µl Transfektionssystem versetzt. Nach 4,5 stündiger Inkubation der Komplexe werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit RPMI-Medium versetzt. Es wird für 4,5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend werden 10 µl BrdU-Arbeitslösung zugesetzt und erneut für 27 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das BrdU-haltige Zellkulturmedium wird entfernt und mit FixDenat-Lösung 30 Minuten inkubiert. Nach Entfernung von FixDenat, welches die DNA denaturiert, wird mit Anti-BrdU-POD-Lösung versetzt und 90 Minuten inkubiert. Die überschüssige Lösung wird entfernt und die Zellen 3 mal mit 200 µl PBS gewaschen. Es wird mit 100 µl Substratlösung versetzt und die enzymatische Farbreaktion nach 15 Minuten durch Zusatz von 25 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt. Anschließend wird mit einem ELISA-Reader die Differenz der Extinktionen bei 450 nm und 650 nm vermessen.

3.7 Konzentrations- und Zeitangaben

Komplexe von Nukleinsäuren mit kationischen Verbindungen

Das **Ladungsverhältnis** (+/-) oder **charge ratio** (+/-) gibt das Verhältnis der Anzahl der möglichen kationischen Ladungsträger (N-Atome) zu den negativen Ladungsträgern in den Nukleinsäuremolekülen (P-Atome) an. Es wird bei der Berechnung des Ladungsverhältnis von einer vollständigen Protonierung der kationischen Ladungsträger ausgegangen.

Ein Ladungsverhältnis von 1:1 (+/-) ist ein elektrisch neutraler Komplex. Ein Ladungsverhältnis von 0,5:1 (+/-) ist negativ geladen, ein kationischer Komplex hat z.B. ein Ladungsverhältnis von 1,5:1 (+/-)

Nukleinsäuren

Die Anzahl der negativen Ladungsträger in den Nukleinsäuremolekülen bezieht sich immer auf die Phosphat-Brücken innerhalb eines Nukleinsäurestranges. Die beiden endständigen Phosphatgruppen von offenkettigen Oligonukleotiden werden bei der Berechnung der Anzahl der negativen Ladungsträger nicht berücksichtigt. Ein 20mer-Oligonukleotid wird daher mit einer Ladungszahl von $z = 19$ berechnet, ein 68mer-Oligonukleotid mit einer Ladungszahl von 67.

Nukleinsäure-Farbstoff-Komplexe

Die Konzentration der Farbstoffe wird bei bekannter molarer Masse des Farbstoffs als bp (Basenpaar)-Verhältnis angegeben. Ein 5:1 (bp)-Verhältnis bedeutet, dass auf 5 Basenpaare (10 Basen) ein Farbstoffmolekül eingesetzt wird, bei einem 50:1 (bp)-Verhältnis wird auf 100 Basen 1 Farbstoffmolekül eingesetzt.

Ist die Konzentration der Farbstofflösung nicht bekannt (PicoGreen™, OliGreen™, Ribogreen™), so wird die Farbstoffkonzentration in µg Nukleinsäure / µl Farbstoffstammlösung angegeben. Die Farbstoffstammlösung ist die Lösung des Farbstoffs in DMSO wie sie vom Hersteller (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) geliefert worden ist.

Zeitangaben

Zeitangaben erfolgen in Formeln, bei denen zeitliche Abhängigkeiten von x-Werten dargestellt werden in der Einheit **Tag**. 1 Stunde entspricht somit $0,04166 \text{ Tage} = 1/24 \text{ Tag}$.

Ergebnisse und Diskussion

DNA-Methoden

4 Präparieren von Plasmid-DNA

Ergebnisse

Das Isolieren der Plasmid-DNA erfolgt nach Vermehrung des pCMVlacZ-Plasmids in Bakterien und anschließender Zentrifugation. Das erhaltene bakterielle Pellet wird dann entweder nach dem *Standardprotokoll der Fa. Genomed* [127] für das Genomed-Maxi-Kit (Balken 1 und 2), nach

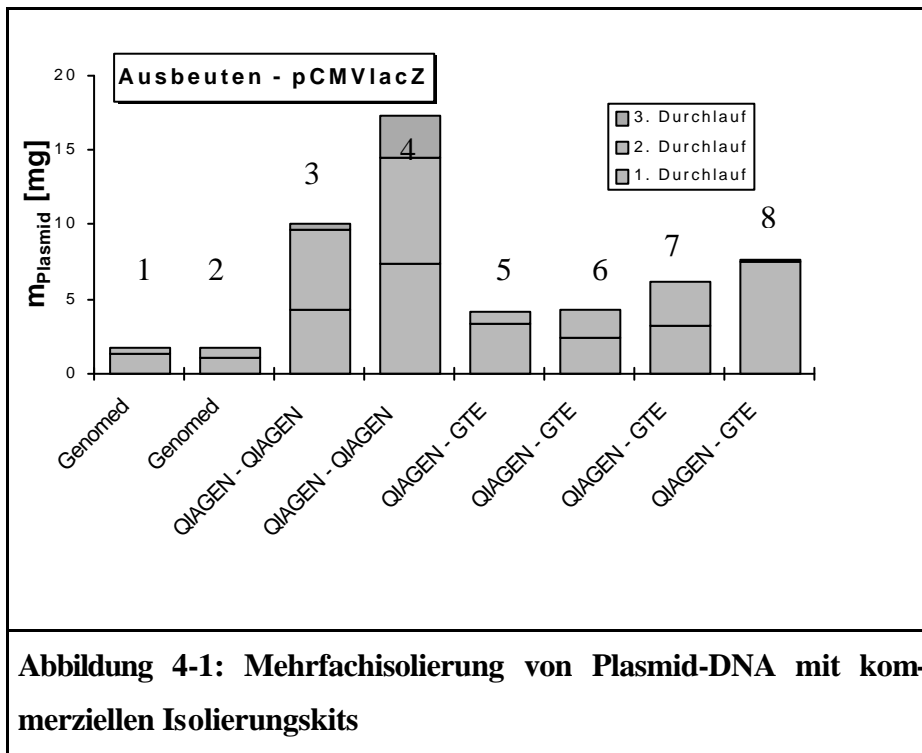


Abbildung 4-1: Mehrfachisolierung von Plasmid-DNA mit kommerziellen Isolierungskits

dem *QIAGEN-Standardprotokoll* [128] für die

QIAGEN-Gigasäulen (Balken 3 und 4) oder nach einer *modifizierten Lyse mit GTE-Puffer* durchgeführt (Balken 5 – 8) (Abbildung 4-1). Mit der Genomed-Methode werden im ersten Durchlauf 1,1 – 1,3 µg Plasmid erhalten. Wird der Durchlauf nochmals über die Säule eluiert, so werden nochmals 0,4 – 0,7 µg Plasmid

erhalten, so dass durch die Mehrfachisolierung die Ausbeute um 45 % gesteigert werden konnte. Ebenso kann mit dem QIAGEN-Protokoll unter Verwendung von QIAGEN-Maxi-Säulen durch Mehrfacheluierung die Ausbeute um 106 % erhöht werden. Das 2. Isolat enthält fast genauso viel DNA wie das erste Isolat. Wird eine modifizierte Prozedur zum Isolieren angewandt, so sinkt die Ausbeute. Es werden nur noch ca. 2,5 - 7 µg (Mittelwert: 4,11 µg) Plasmid-DNA im ersten Eluat erhalten. Im zweiten Eluat ist im Mittel nur noch 1,44 µg Plasmid-DNA erhalten, so dass die Ausbeute durch Zweifachisolieren mit modifizierter Isolierungsmethode um 35 % gesteigert werden kann. Im dritten Eluat ist nur noch sehr wenig DNA vorhanden.

Diskussion

Das Isolieren von Plasmid-DNA erfolgt mit der höchsten Ausbeute, wenn das Protokoll der Herstellerfirma des Kits verwendet wird. Eine Erhöhung der Ausbeute ist durch Mehrfacheluieren des Durchflusses nach dem 1. Eluat möglich. Eine modifizierte Lyse mit GTE-Puffer führt zu einer erniedrigten Plasmid-DNA-Ausbeute. Durch die Mehrfachnutzung einer Säule sind aber erhebliche Kosteneinsparungen bei einer guten DNA-Qualität und -ausbeute möglich. Mit dem Giga-Kit konnten DNA-Mengen von > 5 µg pro 3 l-Bakterienkulturansatz erzielt werden.

Eine Zweifacheluierung unter mehrfacher Säulennutzung ist mit einer modifizierten Lyse-methode, die aufgrund der gelieferten Menge des Reagenziensatzes notwendig ist, geeignet, um Plasmid DNA schnell, in guter Qualität und kostengünstiger zu isolieren.

Transfektionsversuche mit der Glioblastomzelllinie N64 mit den kationischen Liposomen DOSGA 30 und Sp-Chol 10/90 zeigen, dass mit der isolierten Plasmid-DNA das LacZ-Gen exprimiert werden kann (Daten nicht gezeigt). Fluoreszenzspektroskopie (s. 7) zeigt die Kondensierbarkeit der isolierten Plasmid-DNA. Die Strukturen von Kondensaten des isolierten Plasmids sind mit TEM und AFM (s. 9) untersucht worden.

Zusammenfassung

Das Präparieren von Plasmid-DNA erfolgt mit kommerziell erhältlichen Anionenaustauschersäulen. Eine Mehrfachnutzung dieser für den einmaligen Gebrauch bestimmten Säulen ist nach erneuter Equilibrierung möglich. Eine modifizierte Lyse mit GTE-Puffer (Glucose, Tris, EDTA) reduziert die Nukleinsäureausbeute, kann aber die Kosten für die Präparation von Nukleinsäuren vermindern, weil durch die Mehrfachnutzung einer Säule Säulenmaterial eingespart werden kann.

5 Gehaltsbestimmung von Nukleinsäuren

Die exakte Bestimmung des DNA-Gehalts ist Grundvoraussetzung für das quantitative Arbeiten mit Nukleinsäuren. Es wird eine fluorimetrische mit einer photometrischen Gehaltsbestimmung verglichen.

Ergebnisse

5.1 Photometrische Gehaltsbestimmung

Vorteil der photometrischen Gehaltsbestimmung ist die schnelle Durchführbarkeit. Von Nachteil ist aber, dass große DNA-Mengen benötigt werden, um eine ausreichende Extinktion ($> 0,1$) zu erreichen, so dass eine zuverlässige Aussage über den DNA-Gehalt gemacht werden kann. Desweiteren kann mit der UV-photometrischen Gehaltsbestimmung die Reinheit von Nukleinsäuren bestimmt werden. Nukleinsäuren absorbieren bei 260 nm und 280 nm. Über das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm wird ein Reinheitskriterium für die DNA erhalten, da Proteine bei 280 nm absorbieren. Reine DNA muss ein E260/E280-ratio von 1,8 bis 2,0 aufweisen [129]. Allerdings ist dieser Quotient für die Reinheitsprüfung für isolierte Proteine zur Prüfung auf verunreinigende DNA eingeführt worden [130]. Ebenso soll das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm zu 230 nm einen Wert von 2 aufweisen. Bei 230 nm absorbieren beispielsweise Harnstoff und Phenole, die von der Synthese her DNA verunreinigen können. Wenn verunreinigende Stoffe, die bei diesen Wellenlängen absorbieren in der Nukleinsäurelösung enthalten sind, muß der Nukleinsäuregehalt der Lösung fluoreszenzspektroskopisch untersucht werden.

5.1.1 Standard-Nukleinsäuren

Zur Überprüfung des verwendeten Photometers und zur Überprüfung der verschiedenen Standards ist die Extinktion von 4 verschiedenen Standards überprüft worden. Der Gehalt der 4 Proben weicht im Mittelwert um maximal 10 % vom Durchschnittswert ab (Abbildung 5-1). Für die gepoolten Werte aller Messungen ist sowohl mit als auch ohne einen Ausreißerwert (prozentualer Nenngehalt = 1,86) der Mittelwert vom Sollwert der relativen Intensität von 1,000 im 95 % Konfi-

Sample	n	Mittelwert	s.d.	Varianz	p
relative content with outlier	15	1.08418	0.25413	0.06458	p = 0.22035
relative content (2 outliers eliminated)	13	1,05886	0.14779	0,01089	p = 0,06465

Tabelle 5-1: Statistik zur Validierung des Biophotometers mit 4 Standardnukleinsäuren. Gepoolter Mittelwert aus 14 bzw. 15 Einzelwerten mit und ohne 2 Ausreißer; pWerte eines zweiseitigen t-Tests für eine Population (Sollwert = 100 %).

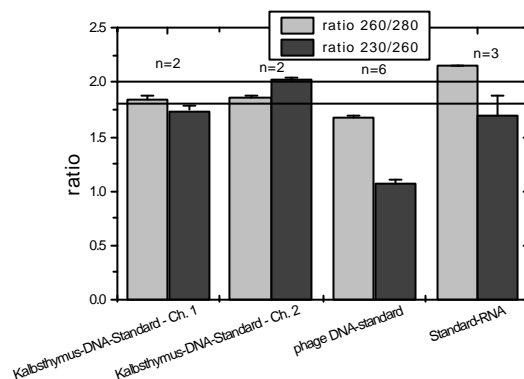
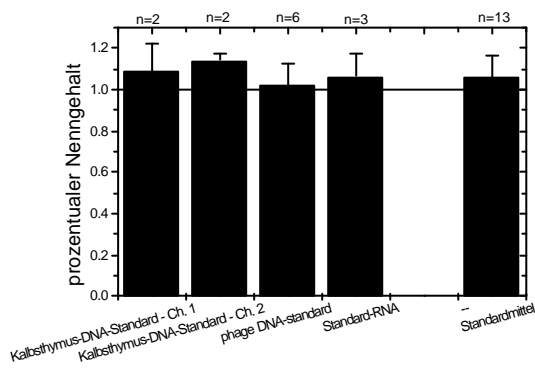


Abbildung 5-1: Photometrische Gehaltsbestimmung verschiedener DNA und RNA-Standards. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen von n = 2 - 6 Bestimmung. Bei der Phagen-DNA wurden 2 Ausreißer von 8 Meßwerten isoliert. Das Standardmittel ist der Mittelwert aus den gepoolten Einzelmessungen der vier Nukleinsäurechargen. Der prozentuale Nenngehalt ist der Gehalt in % bezogen auf den deklarierten Gehalt des jeweiligen Standards.

Abbildung 5-2: Reinheit von Standard-Nukleinsäuren. Bei der 1-Phagen-DNA sind von 8 Messungen 2 Ausreißer des DNA-Gehalts eliminiert worden.

denzintervall nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 5-1).

Die DNA-Qualität ist bei 3 der 4 verwendeten Nukleinsäuren gut. Die λ -Phagen-DNA zeigt eine erhöhte Absorption bei 260 nm und 230 nm, was auf eine nicht ausreichend aufgereinigte DNA hinweist (Abbildung 5-2).

5.1.2 Kommerziell erhältliche Nukleinsäuren

Die photometrische Gehaltsbestimmung für kommerziell erhältliche fluoreszenzmarkierte und nichtmarkierte DNA:DNA-Oligonukleotide und RNA:DNA-Hybridoligonukleotide zeigt starke Abweichungen von den zertifizierten Werten, wobei sowohl Abweichungen des deklarierten und gemessenen Gehalts nach oben und nach unten aufgetreten sind (Abbildung 5-3), so dass ein systematischer Fehler bei der Durchführung der Messung ausgeschlossen werden kann.

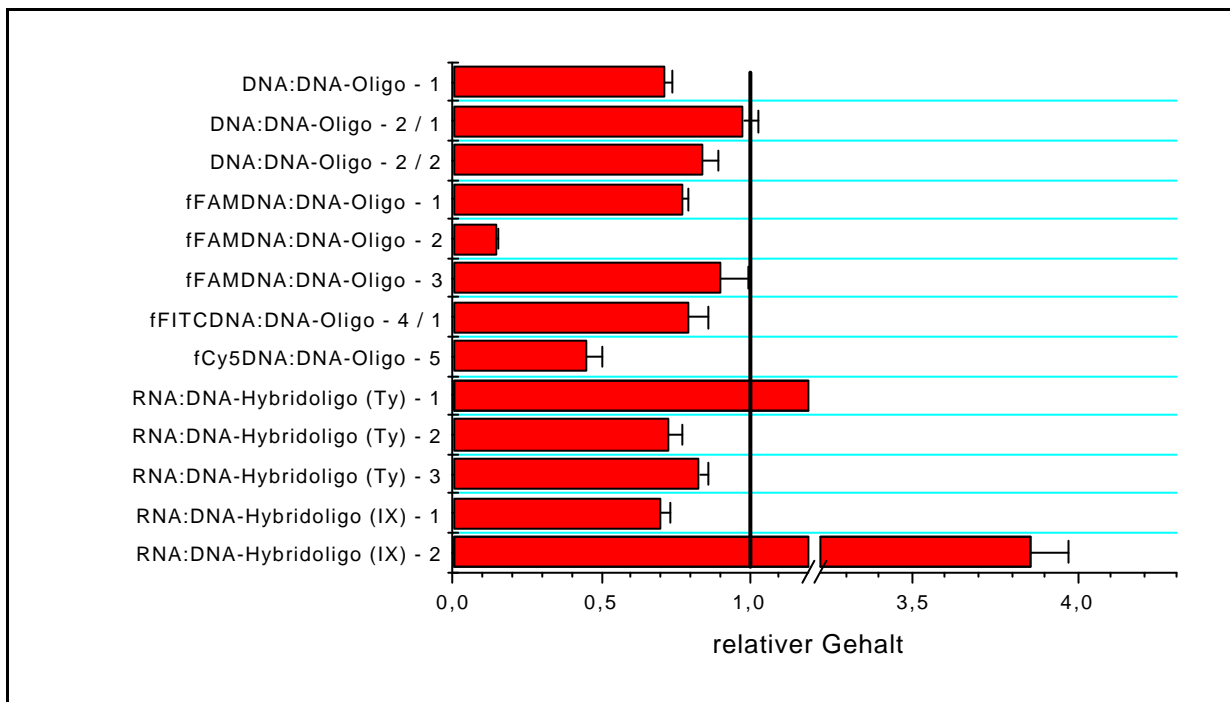
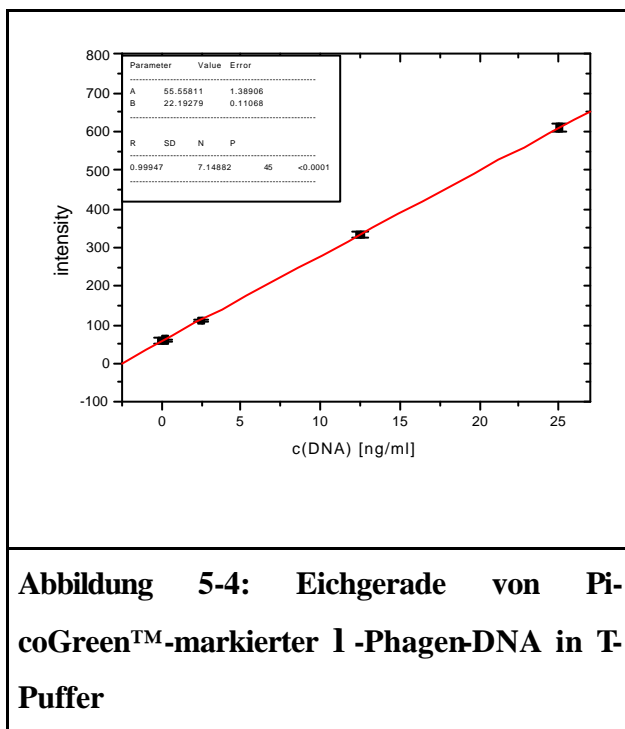


Abbildung 5-3: Abweichung von gemessenem Gehalt und deklariertem Gehalt bei verschiedenen Lieferungen von Oligonukleotiden und Hybridoligonukleotiden. Die letzte Ziffer gibt jeweils die Charge der betreffenden Nukleinsäure an. Die Abweichungen liegen im Extremfall bei 15 % bzw. 375 %. In der Regel wird ein DNA-Gehalt von 70 – 120 % des deklarierten Gehalts gefunden. Aufgrund des geringen Gehalts sind die Präparationen $f_{\text{FAM}}\text{DNA:DNA} - 2$ und $f_{\text{Cy5}}\text{DNA:DNA}$ nicht für weitere Versuche verwendet worden.

Alle Berechnungen bei den folgenden Versuchen (s. 7 - 10.1) basieren deshalb auf den selbstermittelten UV-photometrischen Gehaltswerten für die verwendeten Chargen von Oligonukleotiden und Hybridoligonukleotiden sowie fluoreszenzspektroskopisch oder UV-photometrischen bestimmten Gehaltsangaben für Plasmid-DNA.

5.2 Fluoreszenzspektroskopische Gehaltsbestimmung

Zur fluoreszenzspektroskopischen Bestimmung des Nukleinsäuregehalts wird eine Verdünnungsreihe mit einer Standard-Nukleinsäure bekannten Gehalts hergestellt. Aus der Eichgeraden



kann dann der Gehalt einer unbekannten Nukleinsäureprobe ermittelt werden. In der Abbildung 5-4 ist die Eichgerade von Phagennukleinsäure mit PicoGreen™ dargestellt. Die gute Reproduzierbarkeit der Einzelmessungen und der Regressionskoeffizient von $R = 0,99947$ zeigen, dass durch den PicoGreen™-Assay der Gehalt von Nukleinsäureproben hochreproduzierbar bestimmt werden kann. Die Streuungen der Einzelwerte von Eichgeraden mit Ethidiumbromid sind größer als die Einzelwerte der Messungen mit PicoGreen™ als nukleinsäuremarkierenden Farbstoff.

Diskussion

Vorteile der UV-photometrischen Nukleinsäuregehaltsbestimmung gegenüber der fluoreszenzspektroskopischen Gehaltsbestimmung sind

schnelle Durchführbarkeit der Messungen,

Umrechnungsfaktoren ermöglichen die Gehaltsbestimmung für Nukleinsäuren verschiedenen Polymerisierungsgrads und mit verschiedenen Struktureigenschaften (einzelnsträngig, doppelsträngig). Für solche Proben muss bei fluoreszenzspektroskopischen Gehaltsbestimmungen erst

eine Korrelation des Fluoreszenzsignals der Probe mit der Standardnukleinsäure für die Eichgerade ermittelt werden.

Die Eichgerade für PicoGreen™ zeigt die gute Reproduzierbarkeit der Messung, so dass mit der Fluoreszenzspektroskopie die Genauigkeit der analytischen Methode erhöht ist, allerdings nur solange, wie der Gehalt der Standardnukleinsäure konstant ist. Durch mehrfache Einfrier- und Auftauzyklen nimmt der Gehalt von Nukleinsäureproben kontinuierlich ab. Für Hybridoligonukleotide ist beispielsweise nur bis zu fünfmaliges Auftauen und Einfrieren zugelassen.

Nachteilig bei der UV-Photometrie ist die Abhängigkeit der Extinktion von der Qualität und Betriebsdauer der UV-Lampe, so dass auch bei der UV-Photometrie mit Standardnukleinsäuren gearbeitet werden muss. Durch die Verwendung eines UV-Photometers mit einer Xenon-Blitzlampe, bei der ein konstantes Signal über die Lebensdauer der UV-Lampe ohne Abgleich gegeben ist, kann der Nukleinsäuregehalt von einzel- und doppelsträngigen Proben mit verschiedenen Polymerisierungsgraden schnell und zuverlässig gemessen werden.

Die Notwendigkeit der exakten Messung des Nukleinsäuregehalts ergibt sich aus der schlechten Reproduzierbarkeit des Gehalts von Nukleinsäuren, die von verschiedenen Herstellern geliefert werden. Die in Abbildung 5-3 dargestellten Abweichungen des deklarierten und gemessenen Gehalts zeigen, dass eine Überprüfung des Nukleinsäuregehalts für die Vergleichbarkeit der Messungen zwingend erforderlich ist. Durch Messung von 4 verschiedenen Standardnukleinsäuren unterschiedlichen Polymerisierungsgrades und unterschiedlicher Basenzusammensetzung (DNA vs. RNA) konnte die Genauigkeit des UV-Messgeräts und die Intaktheit der verwendeten Nukleinsäuren gezeigt werden.

Die UV-photometrische Gehaltsbestimmung erweist sich gegenüber der fluorimetrischen Gehaltsbestimmung als vorteilhaft. Zum einen ist der Zeitaufwand für die Durchführung der Messung wesentlich geringer. Zum anderen ist man für die Durchführung der Messung nicht auf eine Standardnukleinsäure für das Aufzeichnen einer Eichkurve angewiesen. Hier ergeben sich Probleme dadurch, dass der Gehalt der Standardsubstanz wiederum nur UV-photometrisch bestimmt werden kann, so dass ein Abbau während der Lagerung der Standardnukleinsäure zu einer systematischen Falschbestimmung des DNA-Gehalts führen würde, wenn nicht eine Kontrolle des DNA-Gehalts durch eine validierte UV-photometrische Methode erfolgen würde.

Bei der UV-photometrischen Gehaltsbestimmung ist das Arbeiten in gepufferter Lösung entscheidend, da der Extinktionskoeffizient der einzelnen Basen und damit der Umrechnungsfaktor für die Berechnung des DNA-Gehalts stark vom pH-Wert der Lösung abhängig ist. Mit absinkendem pH-Wert nimmt der Extinktionskoeffizient für DNA ab. So ist die bei [131] berichtete Abhän-

gigkeit des Extinktionskoeffizienten von der Wasserqualität bei Messung in ungepufferter Lösung durch den pH-Wert des verwendeten Wassers zu erklären.

Auch der Vorteil der höheren Empfindlichkeit einer fluoreszenzspektroskopischen Gehaltsbestimmung stellt gegenüber der UV-photometrischen Gehaltsbestimmung nur scheinbar einen Vorteil dar, weil das zu pipettierende Volumen für diese geringen Substanzmengen bei üblichen DNA-Konzentrationen von 100 µg/ml bis 1 mg/ml so gering ist, dass sowohl für die UV-Spektroskopie (unter Verwendung von 70 µl-Mikroküvetten) als auch für die Fluoreszenzspektroskopie sich der gleiche Substanzbedarf ergibt.

Zusammenfassung

Die exakte Bestimmung des Nukleinsäuregehalts ist für die Entwicklung von Gentherapie-systemen eine essentielle Voraussetzung, weil der Erfolg eines erfolgreichen Gentransfers nicht nur von der DNA-Menge sondern auch von dem Ladungsverhältnis der kondensierenden kationischen Verbindung zur negativ geladenen Nukleinsäure bestimmt wird. Dieses kann nur bestimmt werden, wenn der Gehalts der verwendeten Nukleinsäure exakt bestimmbar ist.

Ein mit einer gepulsten Xenon-Lampe betriebenes UV-Photometer ist für eine GMP- und GLP-konforme Nukleinsäurequantifizierung essentiell. Fluorimetrisch kann der Nukleinsäuregehalt nur in dem Maße bestimmt werden, wie es der Qualität der Standard-DNA entspricht. Eine UV-photometrische Kontrolle des Fluoreszenzstandards ist notwendig.

Für zahlreiche kommerziell erworbene 68mer-Oligonukleotide konnten Abweichungen von dem deklarierten Gehalt ermittelt werden. Daher ist eine Überprüfung des Nukleinsäuregehalts mit einer validierten und reproduzierbaren Methode notwendig.

Liposomen

6 Herstellen und Charakterisieren von Liposomen

Ergebnisse

6.1 Quellung von Liposomen

Die DNA-Kondensation (s. 7- 10.1) ist abhängig von dem verwendeten Puffermedium. Hypoosmotische Pufferlösungen haben sich als vorteilhaft für die DNA-Kondensation erwiesen. Für die Anwendung in der Zellkultur ist aber die Anwendung von isoosmotischen Lösungen erforderlich. Daher müssen die hypotonen Nukleinsäure-Komplexe mit hyper- oder isotoner Lösung versetzt werden, um eine annähernd isotone Lösung zu erhalten.

Weiterhin ist eine kationisch-liposomale Formulierung von DOTAP nur in wässriger, ungepufferter Lösung lagerstabil. Daher erfolgt die Herstellung und Extrusion der Liposomen in Wasser. Das Quellungsverhalten in Phosphatpuffer wird untersucht.

Quellung von in T-Puffer hergestellten AVE™-3 in isotonischer Pufferlösung

100 µl der in T-Puffer hergestellten liposomalen Formulierung werden in einer PCS-Küvette

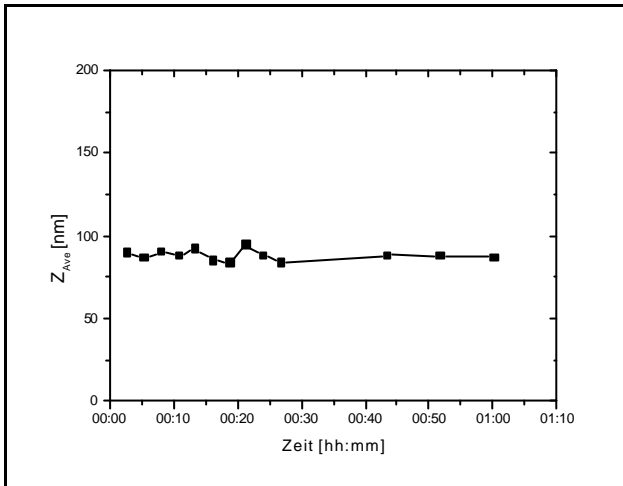


Abbildung 6-1: Quellung von hypoosmolaren AVE™-3 in physiologischem TN-Puffer

vorgelegt und mit 300 µl TN-Puffer verdünnt. Anschließend wird die Änderung der Größe der Liposomen in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Die Meßdauer der einzelnen Messungen beträgt 2 Minuten. Die Größe der AVE™-3 verändert sich nicht signifikant innerhalb von einer Stunde bei kontinuierlicher Messung der Größe (Abbildung 6-1). Es ergeben sich Abweichungen oberhalb und unterhalb des Mittelwertes der Messungen mit zunehmender Meßdauer, so dass auch kein Trend zur Vergrößerung der Liposomen gemessen werden kann. Die in T-Puffer hergestellte

AVE™-3-Formulierung kann also mit einer isotonischen Pufferlösung verdünnt werden, ohne dass es zu einer Quellung oder einer Zerstörung der Liposomen kommt.

Quellung von EiPC und DOTAP-Liposomen in P- und T-Puffer

Kationische DOTAP-Liposomen quellen in Phosphat-Puffer. Die Größe von durch 100 nm-

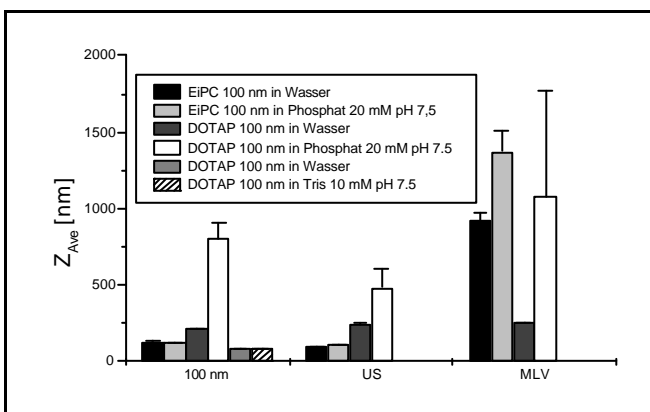


Abbildung 6-2: Quellung von in Wasser hergestellten neutralen EiPC und kationischen DOTAP-Liposomen in Phosphat-Puffer

Membranen extrudierten Liposomen nimmt von 215 nm auf über 815 nm zu. Die große Standardabweichung der im Phosphat-Puffer gequollenen Liposomen ist in dem während der Messung noch fortlaufenden Quellungsprozess begründet. Die US-behandelten DOTAP-Liposomen quellen weniger intensiv. MLV-DOTAPs (d.h. die nach dem Rollieren erhaltene DOTAP-Dispersion) quillt ebenfalls von 250 nm auf Größen von über 1000 nm auf, bei der die obere Messgrenze der PCS erreicht wird.

Die starke Streuung zeigt hier, dass der Wach-

tumsprozess während der Messung noch nicht abgeschlossen war. Eine weitere Zunahme ist aber

messtechnisch nicht mehr erfassbar. Vergleichende Untersuchungen mit EiPC-Liposomen zeigen, dass die Größe der Liposomen in dieser neutralen Formulierung unabhängig davon ist, ob die Messung in Wasser oder im Phosphat-Puffer durchgeführt worden ist. Lediglich die MLV zeigen ein signifikantes Wachstum, wenn die wäßrige Liposomendispersion in Phosphat-Puffer dispergiert wird. Eine 2. Charge DOTAP-Liposomen, die durch 100 nm Membranen extrudiert worden ist, ist sowohl in Reinstwasser als auch in T-Puffer ca. 90 nm groß. Die geringe Standardabweichung zeigt an, dass sich die Größe der Liposomen während der Messung nicht ändert (Abbildung 6-2). Die wäßrigen DOTAP-Liposomen sind in T-Puffer stabil.

6.2 Untersuchungen zur Größe und Stabilität liposomaler Formulierungen für die Gentherapie

Die folgenden beiden Tabellen (Tabelle 6-1 und Tabelle 6-2) zeigen Daten zur Stabilität und Größe verschiedener liposomaler Formulierungen, die für die Durchführung von fluorimetrischen Kondensationsversuchen (s. 7-8), konfokaler Mikroskopie (s. 10) und Toxizitätsversuchen (s. 11.2) verwendet worden sind.

AVETM-3 sind Liposomen mit 33 mol% negativ geladener Lipide in der Formulierung. Werden die Liposomen nach Ultraschallbehandlung 21 x durch 50 nm Nuclepore-Membranen extrudiert, werden Formulierungen mit einer Größe zwischen 90 – 110 nm erhalten. Mehrere Chargen von AVETM-3 waren reproduzierbar in Bezug auf die Größe der erhaltenen Liposomen herstellbar. Die Tonizität des Mediums hat nur einen geringen Einfluß auf die Liposomengröße. In TN-Puffer hergestellte AVETM-3 sind 107 nm im Durchmesser. Die Größe der Liposomen nimmt bei 3wöchiger Lagerung nicht zu. Fluoreszenzmarkierung mit Rhodamin-DOPE hat ebenfalls keinen Einfluß auf die Größe der Liposomen.

Diskussion

Fluorimetrische Kondensationsmessungen ergaben, dass T-Puffer, ein 10 mM Tris-Puffer pH 7,5, für die DNA-Kondensation optimal ist (s. 7 und 8). Daher werden die Kondensationen für Zellkulturversuche auch in T-Puffer durchgeführt. Das Umhüllen der komplexierten DNA mit den viruslipidhüllenähnlich zusammengesetzten AVETM-3 soll ebenfalls in T-Puffer erfolgen. Weil eine 10 mM Tris-Puffer-Lösung nicht isoton ist, kann die Transfektion nicht in T-Puffer erfolgen. Es ist

Probe	Charge	Alter [d]	Größe	Puffer		Messung	Z _{Ave} [nm]	PI		
				Herstellung	Messung		Einzelwerte	Mittelwerte		
AVE™-3	1	1	50 nm	Wasser	Wasser	1	144.8	143.8	0.792	
						2	136.8		0.906	
						3	142.7		0.772	
						4	150.6		1,000	
	2	1	US ¹	T-Puffer	1	132.3	130.5	0.402		
					2	128.7		0.490		
			50 nm			1	113.5	112.6	0.423	
						2	113.4		0.357	
						3	110.8		0.402	
			US			1	154.5	154.3	0.477	
						2	152.9		0.540	
						3	155.6		0.406	
		23	50 nm			1	87.8	89.9	0.326	
						2	89.0		0.222	
						3	92.8		0.174	
						1	88.1	87.7	0.246	
						2	87.8		0.288	
						3	87.1		0.281	
	3	1	50 nm	TN-Puffer	TN-Puffer	1	108	107.5	0.163	
						2	106.8		0.254	
						3	107.6		0.235	
	4b		US		T-Puffer	1	165	162.4	0.286	
						2	162.4		0.266	
						3	161.5		0.284	
						4	160.5		0.320	
	4a		50 nm	T-Puffer	T-Puffer	1	120.4	122.0	0.134	
						2	122.6		0.158	
						3	121.3		0.176	
						4	123.6		0.176	
	4b		50 nm		T-Puffer	1	119.6	120.8	0.168	
						2	119.4		0.185	
						3	122		0.200	
						4	122.1		0.203	
	5		50 nm	T-Puffer	T-Puffer	1	95.1	94.5	0.108	
						2	92.6		0.201	
						3	95.9		0.113	

Tabelle 6-1: Daten zur Größe und Stabilität von liposomalen Formulierungen für den Transfer von Oligonukleotiden (Teil 1)

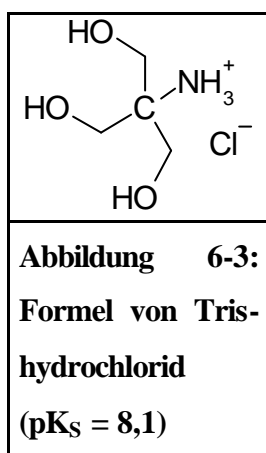
¹ US = Ultraschall; S = Ultraschallspitze, B = Ultraschallbad

Probe	Charge	Alter [d]	Größe	Herstellung	Puffer Messung	Messung	ZAve [nm] Einzelwerte	Mittelwerte	PI
fAVE™-3	1		US		TN-Puffer	1	148.9	145.0	0.513
						2	153.9		0.306
						3	148.4		0.512
			50 nm	T-Puffer	TN-Puffer	2	128.7	110.4	0.49
						1	105		0.027
						2	115.8		0.39
	2		US		T-Puffer	1	112.5	113.3	0.348
						2	114.1		0.367
						1	172.7	169.1	0.223
			50 nm	T-Puffer	T-Puffer	2	170.2		0.252
						3	165.2		0.308
						4	168.4		0.251
	3		50 nm	T-Puffer	T-Puffer	1	100.6	100.4	0.207
						2	103.1		0.199
						3	99.0		0.192
			50 nm	T-Puffer	T-Puffer	4	98.9	89.9	0.216
						1	91.6		0.157
						2	90.4		0.147
DOTAP	1		50 nm	Wasser	Wasser	3	87.7	89.9	0.177
						4	115.8		0.390
						1	112.6	116.8	1,000
DOTAP // DOPE	1		50 nm	Wasser	Wasser	2	124.1		1,000
						3	113.6		1,000
						1	141.6	139.7	0.454
EiPC / Chol	1		US	T-Puffer	T-Puffer	2	137		0.471
						3	140.1		0.455
						1	534.3	554.0	0.261
			50 nm	T-Puffer	T-Puffer	2	563.8		0.068
						3	563.8		0.121
						1	109.1	108.6	0.194
EiPC / Chol / POPG	1		US	T-Puffer	T-Puffer	2	109.8		0.236
						3	107		0.239
						1	233.1	233.8	0.278
						2	232.8		0.254
						3	235.4		0.330

Tabelle 6-2: Daten zur Größe und Stabilität von liposomalen Formulierungen für den Transfer von Oligonukleotiden (Teil 2)

eine Erhöhung der Isotonie mit Natriumchlorid notwendig, um den Zellen ein entsprechendes Milieu zu bieten. Deshalb ist das Quellungsverhalten von AVE™-3, hergestellt in T-Puffer nach Zusatz von TN-Puffer untersucht worden. Es ist kein signifikanter Anstieg der durchschnittlichen Größe der Liposomen meßbar (s. 6.1). Deshalb kann die in der Zellkultur durchgeführte Methode des Komplexierens mit kationischen Transfektionsreagenzien und Umhüllens mit Liposomen in T-Puffer erfolgen. Unmittelbar vor Anwendung des Transfektionssystems erfolgt Verdünnung mit TN-Puffer, so dass ein Puffersystem erhalten wird, welches physiologisch für die Zelle verträglich ist, ohne dass es zu toxischen Schädigungen der Zelle durch das Puffersystem kommt (s. 11.2).

Die Stabilität von kationischen Liposomen ist abhängig vom Medium, in dem die Liposo-



men aufbewahrt werden. Wird eine wäßrige DOTAP-Dispersion mit Phosphat-Puffer verdünnt, so führen Quellungsvorgänge zu einer Vergrößerung des Liposomendurchmessers. Das Phosphation hat fusogene Eigenschaften. Es lagern sich mehrere Liposomen zu größeren Strukturen zusammen. Wird in Wasser oder dem bei pH 7,5 überwiegend protonierten Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, s. Abbildung 6-3) die Größenänderung gemessen, so bleibt die Größe der liposomalen Formulierungen konstant.

Diese Untersuchungen zeigen den Einfluss des umgebenden Milieus auf die Stabilität von kationischen Lipidformulierungen. Insbesondere während der Transfektion kommt die kationische DNA-komplexierende Formulierung in Kontakt mit ein- und mehrwertigen anionischen und kationischen Ionen der Zellkulturmedien. Durch Wechselwirkungen mit den umgebenden Ionen können dann die strukturellen Eigenschaften der Liposomen oder DNA-Lipid-Komplexe verändert werden, wodurch die Transfektionseffizienz modifiziert werden kann. In [132] wird beschrieben, dass das Gegenion von kationischen DOTAP-Analoga einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz hat. Vielleicht sind diese Gegenioneinflüsse durch Wechselwirkungen mit den kationischen Lipiden und Liposomen erklärbar. Wachstumsvorgänge können durch die Gegenionen modifiziert werden. Weitere Untersuchungen der Abhängigkeit der Größe von kationischen Liposomen oder lipidkomplexierter DNA vom Puffersubstrat auf die Komplexstabilität können zeigen, welche Ionenspezies (einwertig, mehrwertig, anionisch, kationisch) die kolloidalen Eigenschaften von Trägersystem und der DNA-haltigen Arzneiform beeinflussen.

AVE™-3 lassen sich mit sehr guter Reproduzierbarkeit herstellen und sind gegenüber kritischen Faktoren, die die Stabilität der Formulierung beeinflussen können, robust (s. 6.2). Im Vergleich zu den kationischen DOTAP-Liposomen, welche in Phosphat-Puffer nicht stabil sind und

sich auch nur unter Verwendung von doppelt destilliertem Wasser herstellen lassen, sind die Voraussetzungen für eine industrielles Upscaling bei AVE™-3 gegeben. Die Stabilität von in T-Puffer hergestellten AVE™-3 in isotonischem TN-Puffer ermöglicht die (effektivere) hypoosomolare Kondensation (s. 8.4) mit folgendem „coating“ der Komplexe mit AVE™-3. Vor der Applikation in das Tier oder auf die Zellen kann dann eine Isotonisierung erfolgen, die nicht zu einer Zerstörung der Integrität des Transfektionssystems durch Wechselwirkung mit den negativ geladenen Liposomen führt. Damit ermöglicht die Kondensation in Kombination mit der reproduzierbaren Protaminkondensation von Nukleinsäuren (s. 7 - 9) mit AVE™-3 ein einfach zu handhabendes Genträgersystem.

Zusammenfassung

Die Qualität der durch Extrusion hergestellten liposomalen Formulierungen erfolgt durch PCS und zeigt die reproduzierbare Herstellbarkeit von AVE™-3-Formulierungen in 10 mM Tris pH 7,5-Puffer. Wird diese Formulierung in blutisotonem Tris/Natriumchlorid-Puffer verdünnt und die Größe vermessen, so sind diese Liposomen stabil. Wäßrige kationische DOTAP-Formulierungen sind in Tris-Puffer ebenfalls stabil, im Gegensatz zum Phosphat-Puffer (20 mM, pH 7,5), in dem die Liposomen aufquellen und fusionieren. Tris-Puffer ist für die Herstellung von Genträgersystemen besser geeignet als Phosphat-Puffer, weil dieser Puffer weniger Wechselwirkungen mit den Trägersystemen eingeht.

Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Kondensation von Nukleinsäuren

Einleitung

Nukleinsäuren sind nichtfluoreszierende Substanzen. Erst mit Hilfe von zugegebenen Fluoreszenzfarbstoffen werden fluoreszierende Nukleinsäure-Farbstoff-Komplexe erhalten. Die Fluoreszenzmarkierung von NA mit Ethidiumbromid wird für die fluoreszenzspektroskopische Quantifizierung von Nukleinsäuren [133] und zur Sichtbarmachung von Nukleinsäuren auf Agarosegelen verwendet.

Die Charakterisierung der Kondensation von DNA mit kationischen Reagentien erfolgt durch den sog. „dye exclusion assay“ (Farbstoffausschlußverfahren) [134]. Wird der fluoreszierende DNA-Farbstoff-Komplex mit kondensierenden oder komplexierenden Reagentien versetzt, so ändert sich die Struktur der DNA, die zu einer Verminderung der Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts führt [132]. Die Abnahme der Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts kann zur Quantifizierung der Komplexbildung herangezogen werden.

7 Stabilitätsuntersuchungen von komplexierter DNA (Kinetikassay)

Einleitung

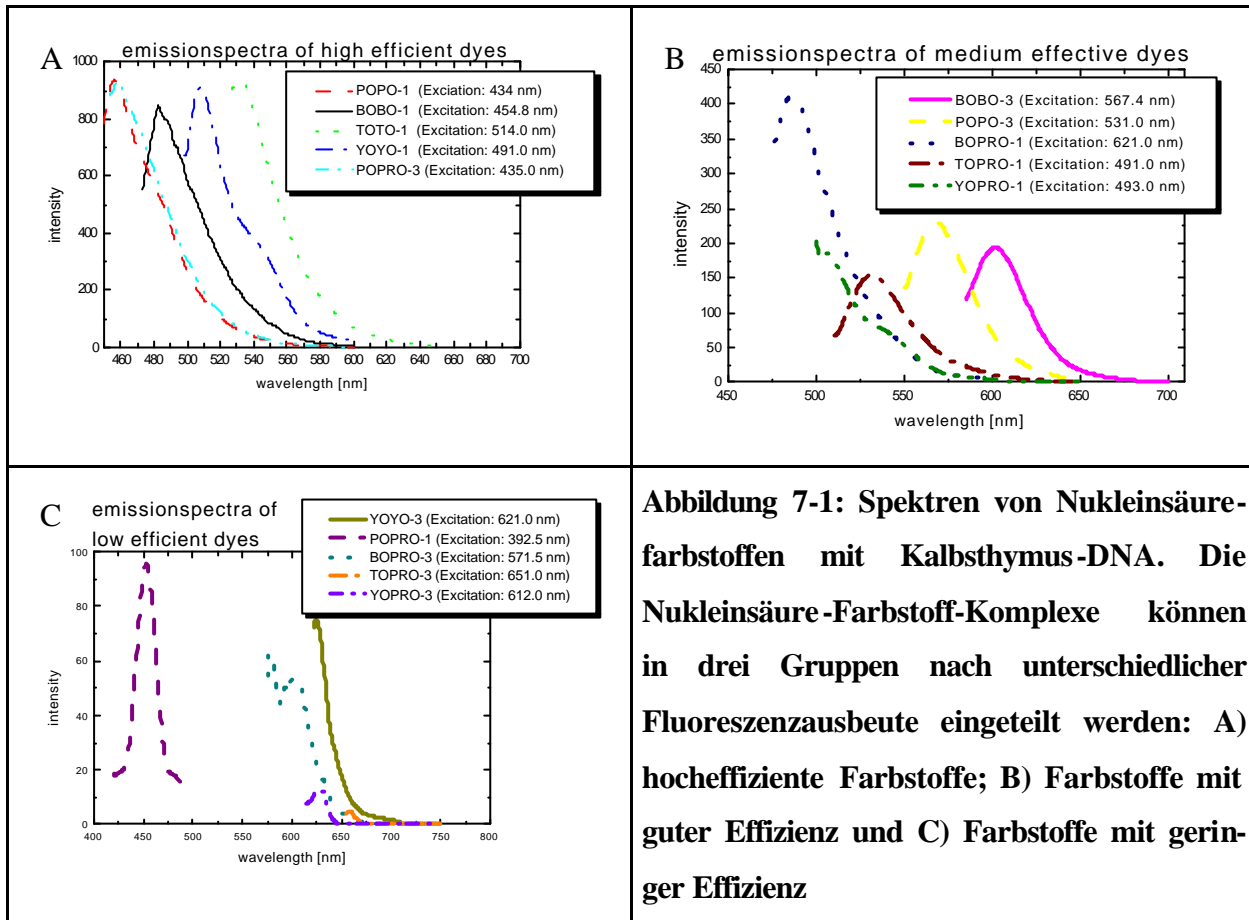
Die Untersuchung des Ausmaßes der Kondensation und der Stabilität von Nukleinsäurekondensaten ist notwendig, um wichtige Prozessparameter bei der Transfektion von Zellen kontrollieren zu können. Die Auswahl der geeigneten Inkubationszeit ist ein wichtiger Parameter für die Optimierung von Gentransfersystemen. Durch die Optimierung der Inkubationszeit mit einem einfachen und schnellen analytischen Assay soll es möglich sein, nach Korrelation mit Zellkulturdaten den Prozessparameter Inkubationszeit durch ein biophysikalisches Meßverfahren zu optimieren. Desweiteren soll die physikalische Stabilität von Nukleinsäurekomplexen mit einem solchen Analyseverfahren beurteilt werden.

Das Ziel ist die Entwicklung eines analytischen Assays mit dem Komplexreifungsvorgänge charakterisiert werden können und die Stabilität von DNA-Komplexen dargestellt werden kann. Weiterhin ist es das Ziel, die „dye-exclusion-technique“ durch Auswahl eines geeigneten Farbstoffs zur Fluoreszenzmessung zu optimieren.

Ergebnisse

7.1 Spektren von DNA-Farbstoff-Komplexen

Um die Eignung der DNA-Farbstoffkomplexe für die Messung der DNA-Kondensation zu überprüfen, sind Spektren der Farbstoffe mit Thymus-DNA aufgezeichnet worden. 200 ng DNA sind mit Farbstoff gemischt worden. Die Spektren sind in einer Quarzglasküvette gemessen worden (Abbildung 7-1). Die DNA-Menge und das DNA-Farbstoffmengenverhältnis ist in allen Proben 50:1 (bp). Es erfolgt keine Normierung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten. Die Spaltbreiten sind angepasst, um ein optimales Meßsignal zu erhalten.



7.2 Ausbleichen von DNA-Farbstoff-Komplexen

Durch die Einwirkung von Licht auf DNA-Farbstoff-Komplexe kann ein Ausbleichen des Farbstoffs erfolgen. Die Charakterisierung des Ausbleichverhaltens der DNA-Farbstoff-Komplexe ist ein wichtiger Parameter zum Verständnis der kinetischen Vorgänge bei der Messung der Kondensation von Nukleinsäuren mit Fluoreszenzfarbstoffen. Starkes Ausbleichen der Nukleinsäure-Farbstoffkomplexe führt dazu, dass bei der Auswertung des Fluoreszenzquenching durch DNA-Kondensation Intensitätsveränderungen durch Ausbleicheffekte in die Berechnung der Kondensation einbezogen werden müssen.

Die DNA-Farbstoffkomplexe werden hinsichtlich der

- Geschwindigkeit des Ausbleichens und der
- Streuung von acht Einzelmessungen

beurteilt.

Ethidiumbromid (EB) ist der Farbstoff, der am häufigsten für die Messung der Kondensation von Nukleinsäuren verwendet wird. In Abbildung 7-2 ist das Ausbleichverhalten von EB-Plasmid-Komplex dargestellt. Die EB-DNA-Komplexe bleichen innerhalb von 2,5 Stunden nicht aus. Die Streuung von 8 Einzelmessungen ist aber sehr groß, so dass EB als Fluoreszenzfarbstoff für die Messung der Kondensation aufgrund dieser Streuungen schlecht geeignet ist. Die Stabilitätskurve ist eine wichtige Basis für die Berechnung der relativen Fluoreszenzintensitäten (s. Formel 3-1, S. 64). Durch die starke Streuung der Einzelwerte, die über die Messdauer von 2,5 Stunden reproduziert werden konnte, ist die Basis für eine exakte Berechnung der relativen Fluoreszenzintensitäten nicht gegeben.

<p>Abbildung 7-2: Ausbleichen von EB-Plasmid-Komplexen in Tris-Puffer mit einer Farbstoffkonzentration von 5:1 (bp)</p>	<p>Abbildung 7-3: Ausbleichen von Ethidiumhomodimer-2 - Plasmid-DNA-Komplexen mit einer Farbstoffkonzentration von 50:1 (bp) in Tris-Puffer</p>
<p>Dargestellt sind der Mittelwert (MW) (untere Kurve) sowie der MW + 1 SD (Standardabweichung) von 8 individuellen Messwerten (obere Kurve) –wie auch in den folgenden Abbildungen in 7.2. Die relative Fluoreszenzintensität $RI_{bleach}^{t=x}$ für Abbildung 7-2 - 7-15 wird nach Formel 3-2 berechnet.</p>	

Ethidiumhomodimer-2 (EthH-2)-Plasmid-DNA ist über 15 Stunden stabil (Abbildung 7-3). Innerhalb der ersten 25 Minuten steigt die Fluoreszenz auf 106 % des Ausgangswerts an. Die Standardabweichung zwischen den einzelnen Messungen beträgt im Durchschnitt 6,1 %, so dass Ethidiumhomodimer-2 aufgrund der Ausbleichkinetik für Kondensationsmessungen geeignet ist.

Das Fluoreszenzsignal von **Acridinorange** (AO) markierter Plasmid-DNA zeigt ein mittelstarkes Ausbleichen. Unabhängige Einzelmessungen zeigen starke Abweichungen des Verlaufs des Ausbleichens (Abbildung 7-4). Bei den Messungen A und C mit einem Messintervall von 180 Se-

kunden verläuft die Kinetikkurve des Ausbleichens sigmoidal. Bei der Messung B mit einem Messintervall von 1800 Sekunden ist ein zweiphasiger Verlauf erkennbar. Das Ausbleichen ist vom Messintervall abhängig. Wird im Intervall von 180 s gescannt (300 Einzelmessungen, A und C), so erfolgt ein schnelleres und stärkeres Ausbleichen als bei Messungen mit einem Messintervall von 1800 s, bei dem die Proben lediglich 30 mal dem Lichteinfluß ausgesetzt sind.

In der Phase I steigt die Fluoreszenz innerhalb von 3 Stunden um 10 % bezogen auf den Ausgangswert an. Anschließend erfolgt in der Phase II eine lineare Abnahme der Fluoreszenz (Abbildung 7-4 B).

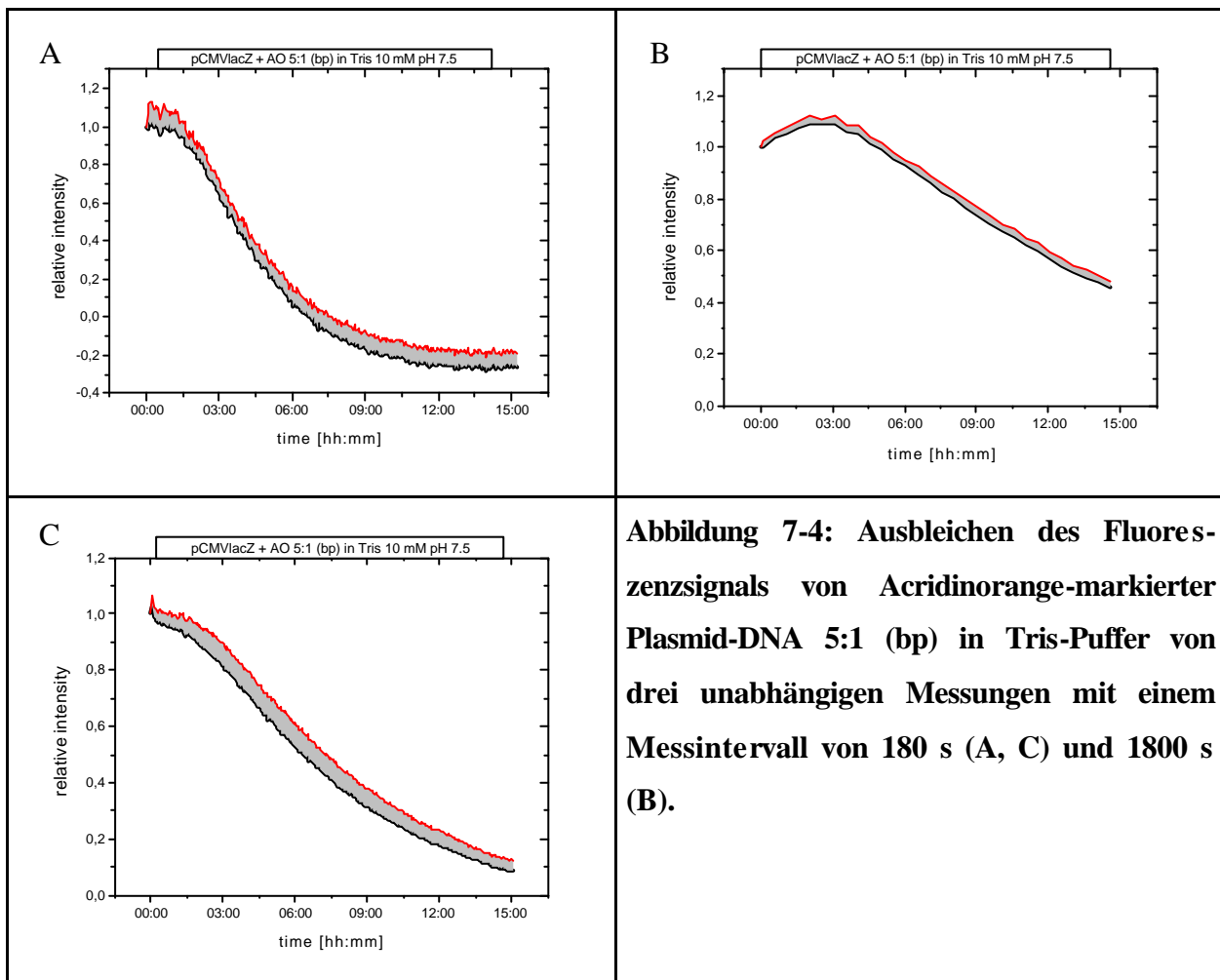


Abbildung 7-4: Ausbleichen des Fluoreszenzsignals von Acridinorange-markierter Plasmid-DNA 5:1 (bp) in Tris-Puffer von drei unabhängigen Messungen mit einem Messintervall von 180 s (A, C) und 1800 s (B).

Die Standardabweichung der Intensitäten von **TOTO-1**-Plasmid-Komplexen ist gering. Die Fluoreszenzintensität nimmt über 15 Stunden um 20 % zu, was mit einer Erhöhung der DNA-Konzentration durch Verdunstung von Puffer erklärt werden kann.

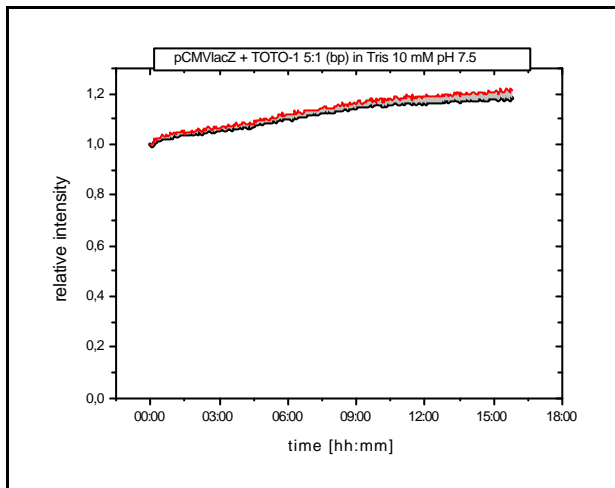


Abbildung 7-5: Ausbleichen von TOTO-1 - Plasmid-DNA-Komplexen 5:1 (bp) in Tris-Puffer

YOYO-1 – Komplexe (Abbildung 7-6) zeigen kein Ausbleichen des Fluoreszenzsignals. Ein geringer Anstieg der Fluoreszenz ist sowohl bei einer Konzentration von 5:1 (bp) bzw. 50:1 (bp) messbar und kann mit der Verdunstung von Puffer während der Messung erklärt werden.

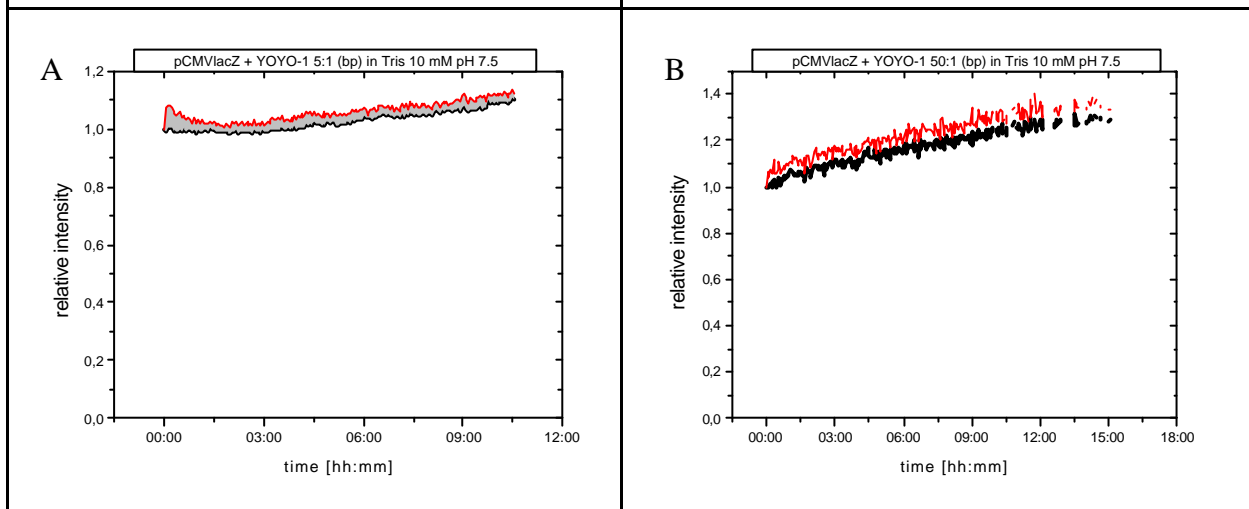


Abbildung 7-6: Ausbleichen von YOYO-1-markierter Plasmid-DNA mit unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen: A) 5:1 (bp) und B) 50:1 (bp) in Tris-Puffer

Das Ausbleichen des Fluoreszenzsignals von **BOBO-3**-markierter Plasmid-DNA (Abbildung 7-7) erfolgt in zwei Phasen. Nach 55 Minuten wird der 50 % Restintensitätspunkt erreicht. Nach 2 Stunden verbleibt eine relativ konstante Restintensität von 20 – 25 % der Ausgangsintensität. Aufgrund des schnellen Ausbleichens ist BOBO-3 für kinetische Kondensationsmessungen nicht geeignet.

POPO-3 bleicht ebenfalls sehr schnell aus. Innerhalb von 1 Stunde ist auch hier wie beim BOBO-3 nur noch eine Restintensität von ca. 10 % vorhanden, so dass POPO-3 lediglich für Kurzzeitmessungen als Farbstoff geeignet ist.

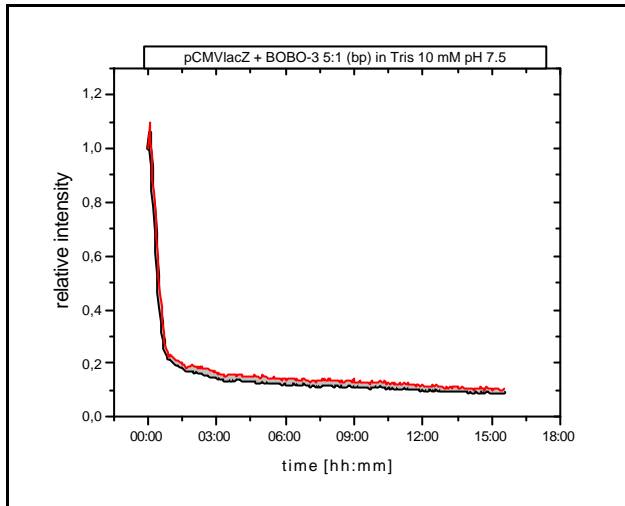


Abbildung 7-7: Ausbleichen von BOBO-3 markierter Plasmid-DNA 5:1 (bp) in Tris-Puffer

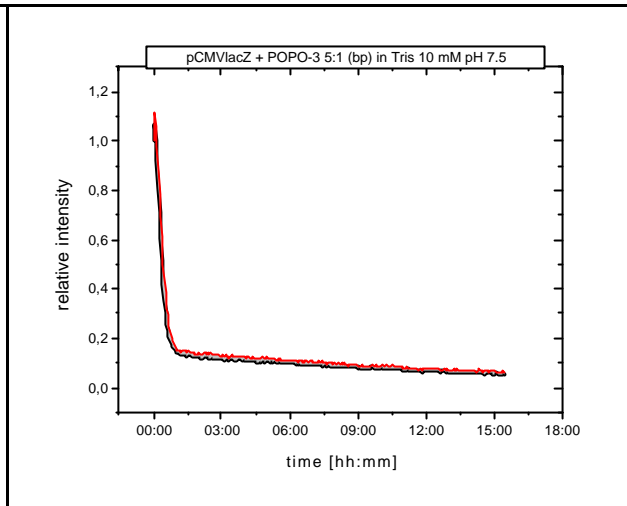


Abbildung 7-8: Ausbleichen von POPO-3 markierter Plasmid-DNA 5:1 (bp) in Tris-Puffer

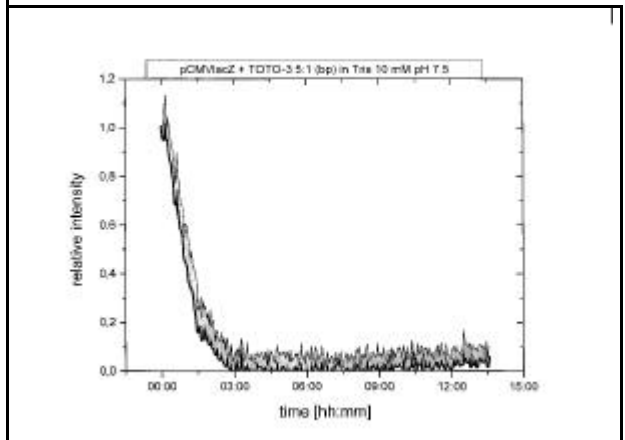
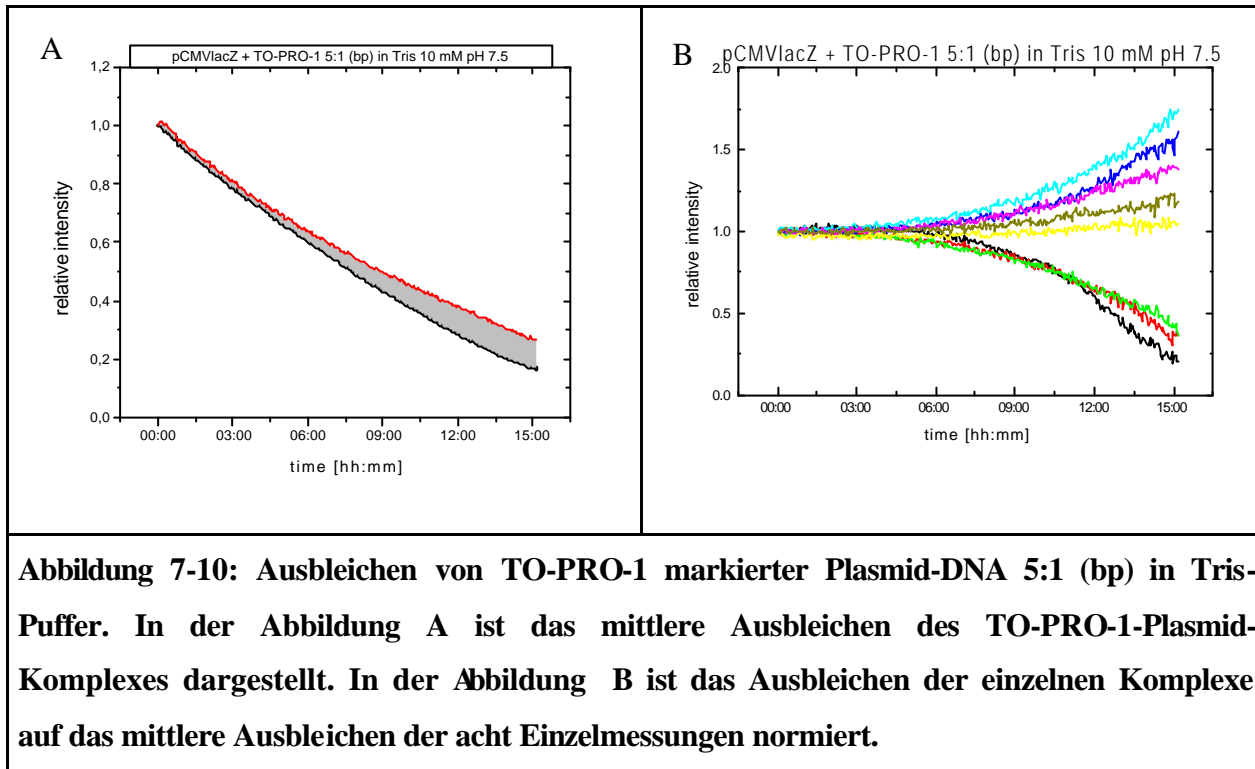


Abbildung 7-9: Ausbleichen von TOTO-3 markierter Plasmid-DNA 5:1 (bp) in Tris-Puffer

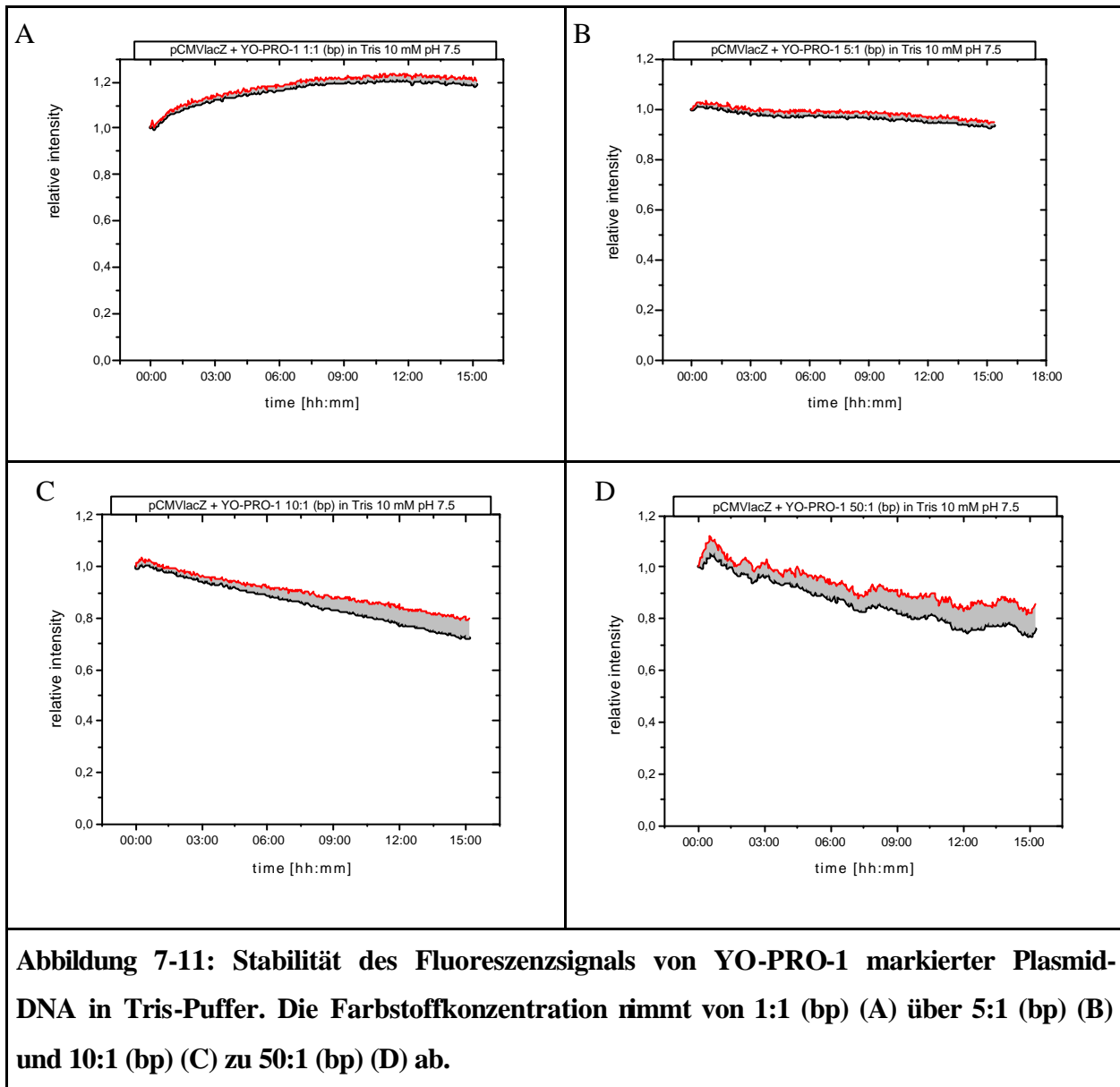
TOTO-3 markierte Plasmid-DNA bleicht innerhalb von 3 Stunden vollständig aus (Abbildung 7-9). Innerhalb der ersten 15 Minuten nimmt die Fluoreszenz nach einem kurzzeitigen Anstieg um 2 % nach 7 Minuten auf 95 % der Ausgangsintensität ab. Anschließend fällt die Fluoreszenz schnell exponentiell bis auf die Basislinie ab. Nach 50 Minuten beträgt die Fluoreszenzintensität 50 % der Ausgangsintensität, die Eliminationshalbwertszeit 57 Minuten, so dass mit TOTO-3 maximal 1,5 – 2 Stunden DNA-Kondensation gemessen werden kann.

Die Kinetik des Ausbleichens von **TO-PRO-1** – Plasmid-DNA lässt sich bis zum Erreichen der Basislinie mit der Funktion $y = 0.95515 - 1.33119 / \text{Tag} * x$ beschreiben (Kinetik 0. Ordnung). Nach 8:12 Stunden beträgt die Restintensität noch 50 % der Ausgangsintensität. Nach 5 Stunden nimmt die Streuung stark zu (Abbildung 7-10, A). Bei drei Einzelmessungen nimmt die Fluoreszenz bezogen auf die mittlere Fluoreszenz der acht individuellen Messungen zu. Bei zwei einzelnen

Messungen ist die Fluoreszenz praktisch fast unverändert, während drei Einzelmessungen ein verstärktes Ausbleichen zeigen, so dass nach 15 Stunden diese drei DNA-Farbstoff-Komplexe praktisch keine Eigenfluoreszenz mehr aufweisen (Abbildung 7-10 B). Durch das variable Ausbleichverhalten der DNA-Farbstoffkomplexe, welches noch genauer untersucht werden muß, ist TO-PRO-1 für kinetische Messungen der DNA-Kondensation nicht geeignet.



In Abbildung 7-11 ist das Ausbleichen von **YO-PRO-1**-markierter Plasmid-DNA dargestellt. Bei einer Farbstoffkonzentration von 1:1 (bp) und 5:1 (bp) ist das Fluoreszenzsignal konstant. Bei einer Farbstoffkonzentration von 10:1 (bp) bzw. 50:1 (bp) nimmt die Fluoreszenz linear ab. Innerhalb von 15 Stunden wird bei keinem Ladungsverhältnis der 50 %-Wert erreicht. Die Streuung der Einzelwerte nimmt mit zunehmendem bp-ratio (= abnehmender Farbstoffkonzentration) zu. Je mehr Farbstoff zugesetzt wird, desto geringer ist die Streuung der Messwerte. YO-PRO-1 ist in allen untersuchten Farbstoffkonzentrationen für die Durchführung von Kinetikmessungen geeignet.



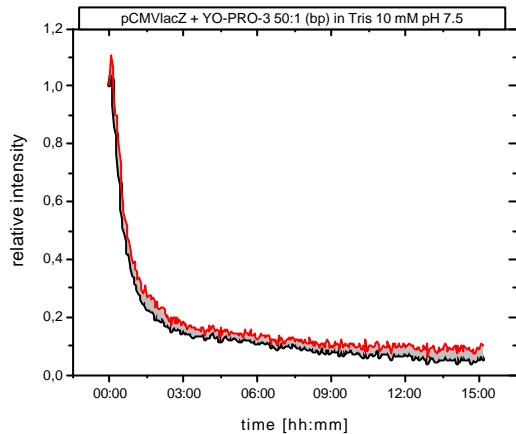


Abbildung 7-12: Ausbleichen von YO-PRO-3 markierter Plasmid-DNA 5:1 (bp) in Tris-Puffer

YO-PRO-3 – Plasmid-DNA-Komplexe bleichen innerhalb von 3 Stunden aus. Nach 34 Minuten beträgt die Restintensität 50 %. Nach 1 Stunde beträgt die Restintensität 39 % der Ausgangsintensität. Die Restintensität nach drei Stunden beträgt 17 %. Aufgrund des schnellen Ausbleichens ist YO-PRO-3 nicht für die Messung der Kondensation von Nukleinsäuren geeignet.

BO-PRO-3 markierte Plasmid-DNA zeigt ein Ausbleichen nach einer Kinetik 0. Ordnung ($y = 0.92542 - 1.33165 / \text{Tag} * x$). (Abbildung 7-13). Nach 7 h 40 min beträgt die Fluoreszenzintensität noch 50 % der Ausgangsintensität. Die

Streuung zwischen den einzelnen Messungen ist gering. Aufgrund des relativ starken Ausbleichens des BO-PRO-3-Plasmid-Komplexes ist BO-PRO-3 für kinetische Kondensationsmessungen nur bedingt geeignet.

TO-PRO-3 – markiertes Plasmid zeigt einen initialen Anstieg der Fluoreszenz. Nach 15 Minuten fällt das Signal linear ab, um nach ca. 3 Stunden ein Minimum zu erreichen. Ein anschließend erneuter Anstieg der Fluoreszenz führt zu einem Maximum nach 4,5 Stunden, nach 15 Stunden ist keine Fluoreszenz mehr nachweisbar (Abbildung 7-14). Die Standardabweichung der

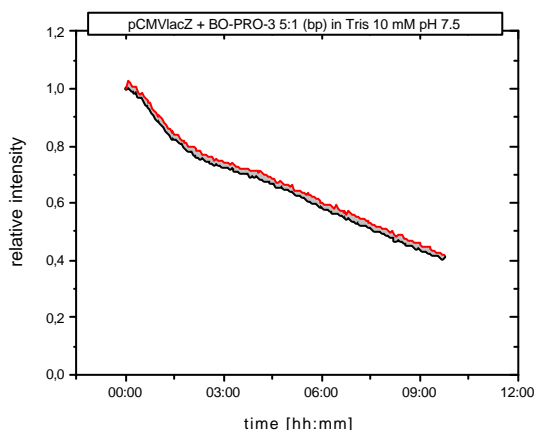


Abbildung 7-13: Ausbleichen von BO-PRO-3 markierter Plasmid-DNA 5:1 (bp) in Tris-Puffer

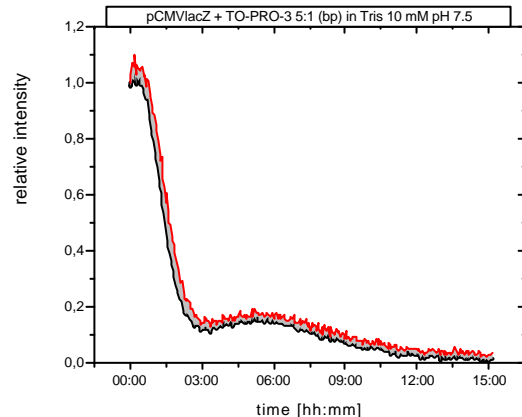
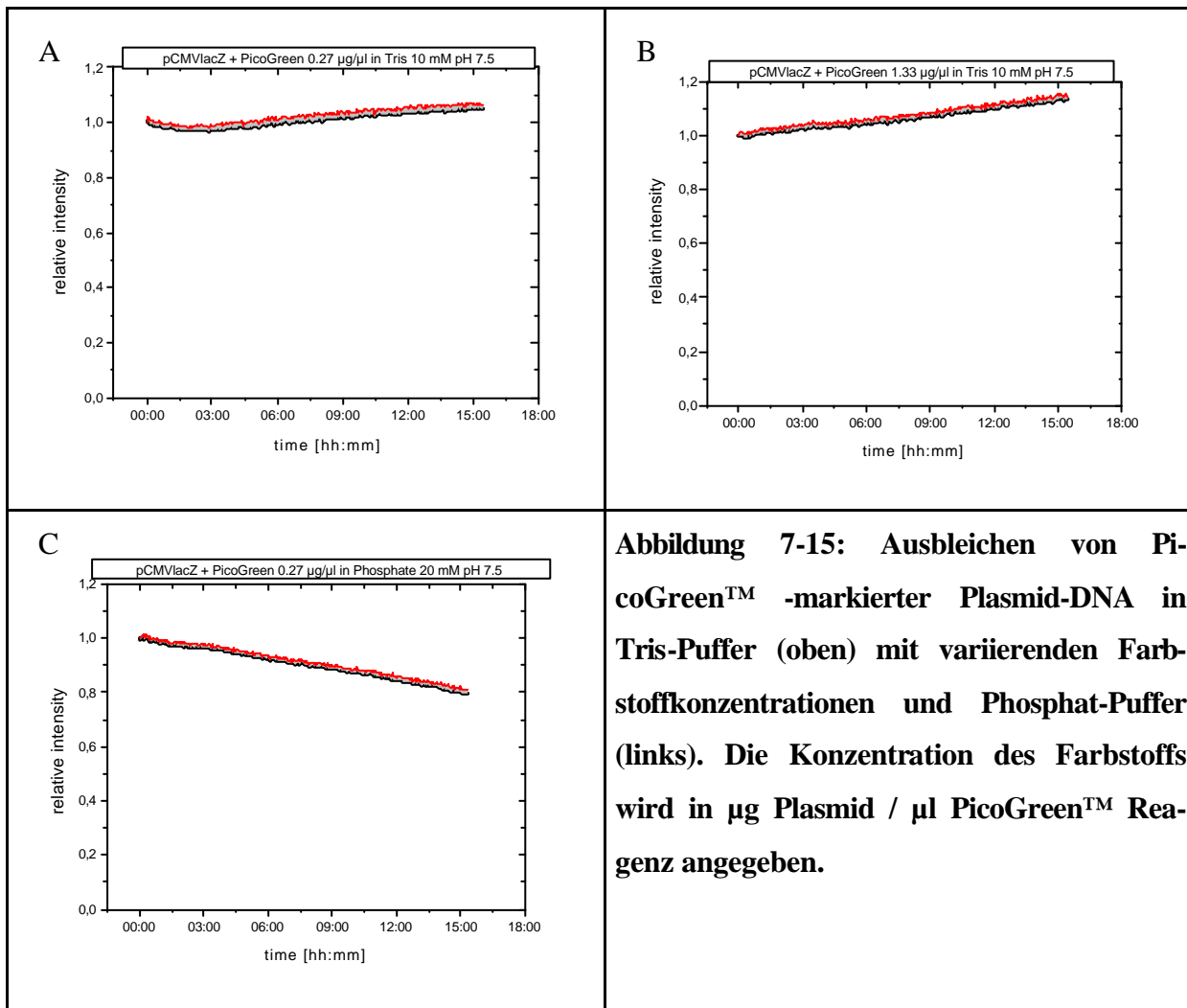


Abbildung 7-14: Ausbleichen von TO-PRO-3-Plasmid-Komplexen 5:1 (bp) in Tris-Puffer

acht einzelnen Messungen ist über den gesamten Zeitraum gering.

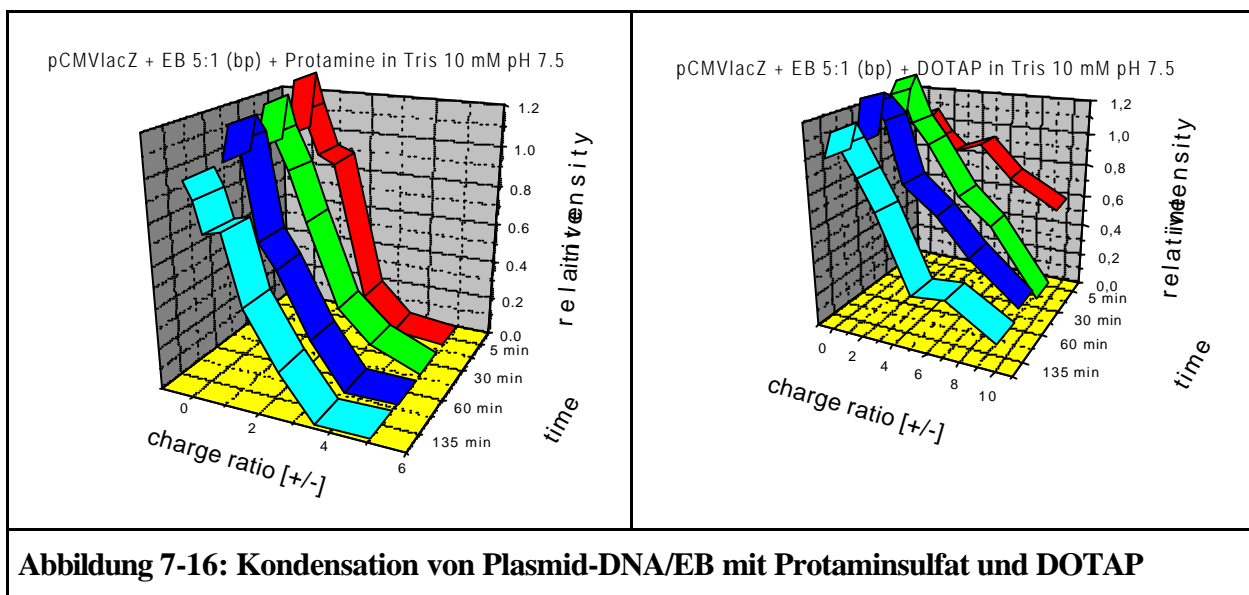
TO-PRO-3 ist für kurzzeitige Messungen bis 1,5 Stunden als Fluoreszenzfarbstoff für die Messung der Kondensation von Nukleinsäuren geeignet. Soll die Kondensation über einen längeren Zeitraum hinaus gemessen werden, so verhindert das starke Ausbleichen eine exakte Ermittlung der Kondensation.

In der Abbildung 7-15 ist das Ausbleichen von **PicoGreen**TM-markierter Plasmid-DNA dargestellt. Sowohl mit 0,27 µg Plasmid-DNA / µl PicoGreenTM-Reagenz als auch mit 1,33 µg Plasmid-DNA / µl PicoGreenTM-Reagenz bleichen die Farbstoffkomplexe nicht aus. Das Signal ist für 15 Stunden stabil. In Phosphat-Puffer bleicht der DNA-Farbstoff-Komplex schwach aus. Nach 15 Stunden beträgt die Restfluoreszenz noch 80 % der Ausgangsintensität. Das Ausbleichen erfolgt nach einer Kinetik 0. Ordnung ($y = 1.00245 - 0,31191 / \text{Tag} * x$). Die Streuung der Einzelwerte ist minimal.

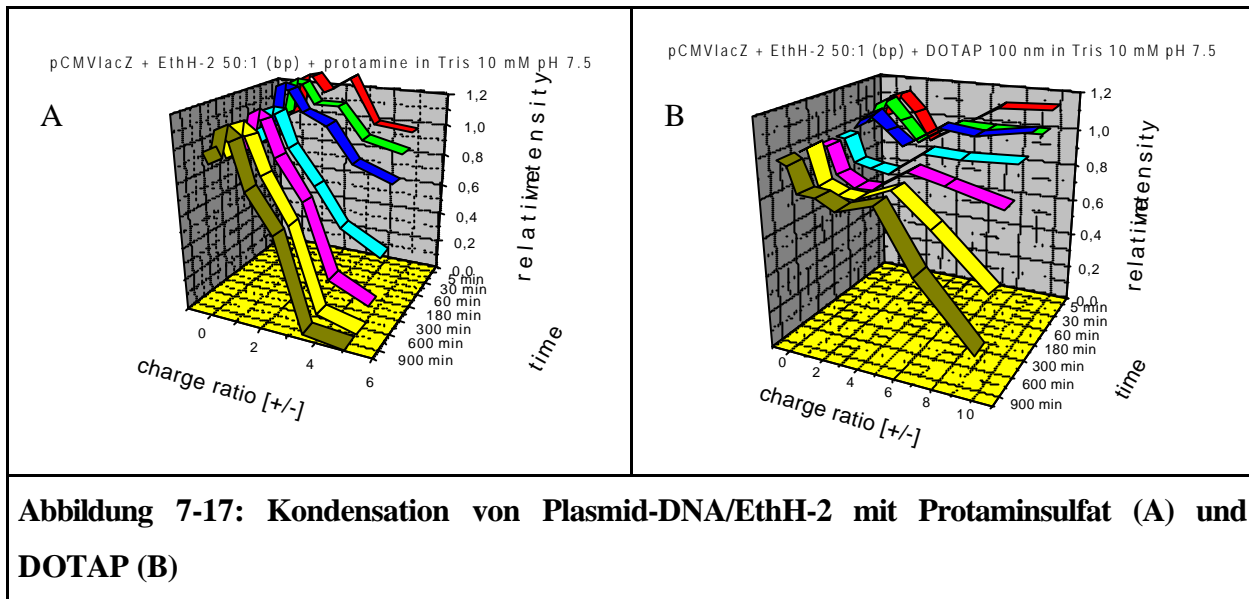


7.3 Fluorimetrische Messung der DNA-Kondensation I: Fluoreszenzfarbstoffe

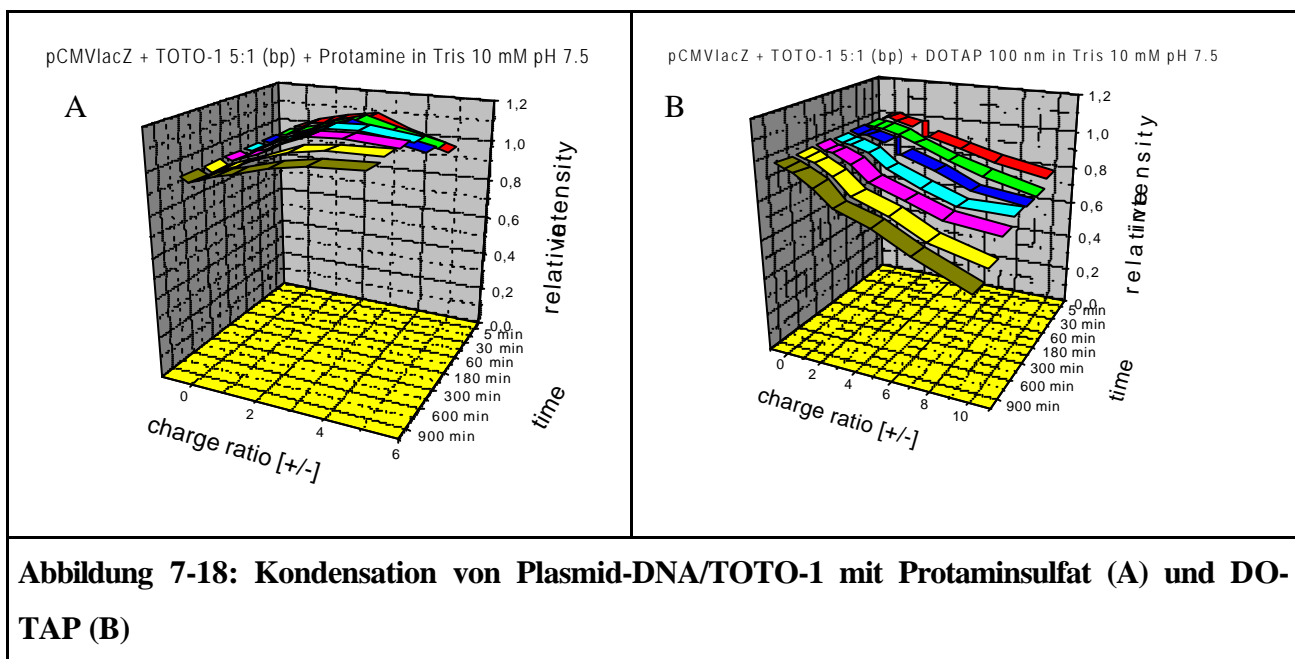
Die Titrationskurve von **Ethidiumbromid**-DNA-Protamin-Komplexen ist dadurch gekennzeichnet, dass *negativ geladene Komplexe* von DNA mit Protaminsulfat und DOTAP-Lipiden bei Inkubationszeiten < 60 Minuten zu einer Erhöhung der relativen Fluoreszenzintensität führen. Kationische Protaminkomplexe sind innerhalb von 5 Minuten vollständig kondensiert. Es wird die Basislinie erreicht und die Komplexe sind über einen Zeitraum von 135 Minuten stabil. *Kationische Komplexe* von DOTAP-Plasmid-DNA zeigen eine zeitabhängige Abnahme der Fluoreszenzintensität. Nach 5 Minuten ist bei einem Ladungsverhältnis von 10:1 (+/-) eine relative Restintensität von 60 % vorhanden, die dann nach 30 Minuten den Endwert von 25 % erreicht hat (Abbildung 7-16).



Wird **Ethidiumhomodimer-2** als Fluoreszenzfarbstoff verwendet, so ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität sowohl bei der Kondensation mit Protaminsulfat als auch mit DOTAP zeitabhängig. *Negativ geladene Komplexe mit Protaminsulfat* führen zu allen Zeitpunkten zu einem Fluoreszenzanstieg. Mit *kationischen Protaminkomplexen* ist nach 5 Minuten keine DNA-Kondensation meßbar. Erst nach 30 Minuten ist Kondensation nachweisbar, die dann mit zunehmender Meßzeit zunimmt. Komplexierung mit *DOTAP* zeigt ein ähnliches Verhalten, allerdings ist eine Inkubationszeit von 2 Stunden notwendig, damit eine erste DNA-Kondensation nachgewiesen werden kann. Eine Veränderung der Fluoreszenzintensität ist bei Kondensation mit DOTAP noch nach 10 und 15 Stunden nachweisbar (Abbildung 7-17).



Wird als Fluoreszenzfarbstoff **TOTO-1** (Abbildung 7-18 und Abbildung 7-19) verwendet, so ist mit *Protaminsulfat* als kationische Verbindung keine Abnahme der Fluoreszenzintensität messbar. Neutrale und negativ geladene Komplexe zeigen keine Änderung der Fluoreszenzintensität. Überwiegt die positive Ladung die negative Ladung, so steigt die Fluoreszenz über 100 % an. Nach drei Stunden wird bei allen Komplexen ein stabiles Signal erhalten. *DOTAP* ist in der Lage, DNA zu kondensieren. Die Fluoreszenzintensität nimmt linear mit der zugesetzten Menge des kationischen Lipids ab. Mit zunehmender Inkubationsdauer wird die DNA stärker kondensiert. Die Streuung einzelner Messreihen ist sehr gering.



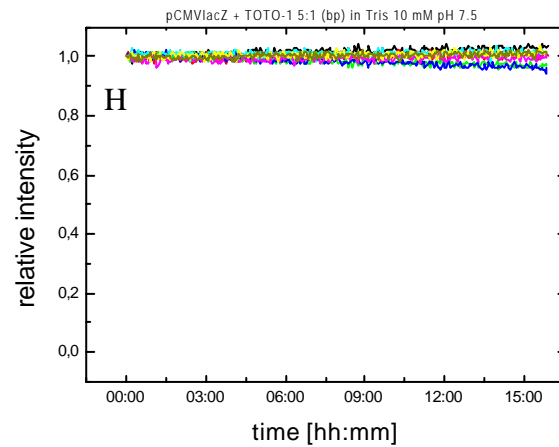
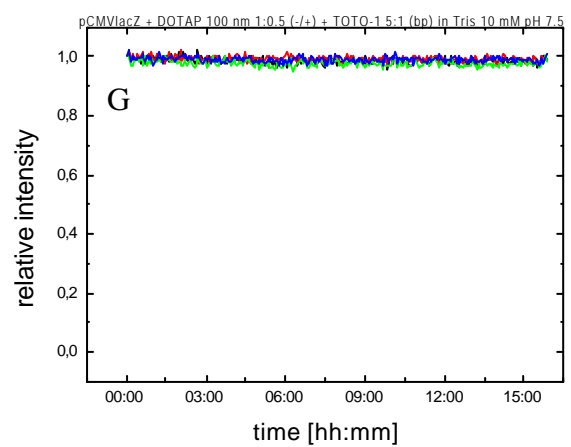
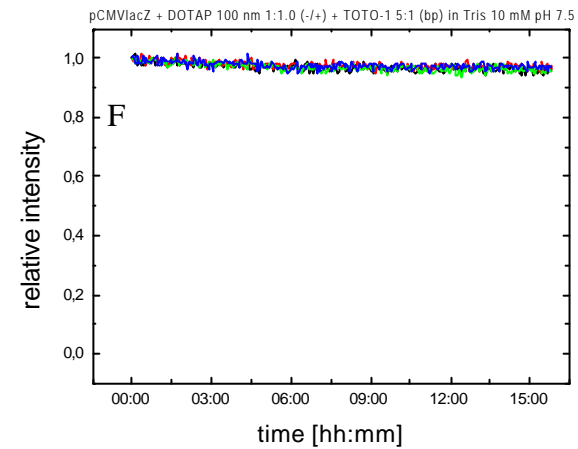
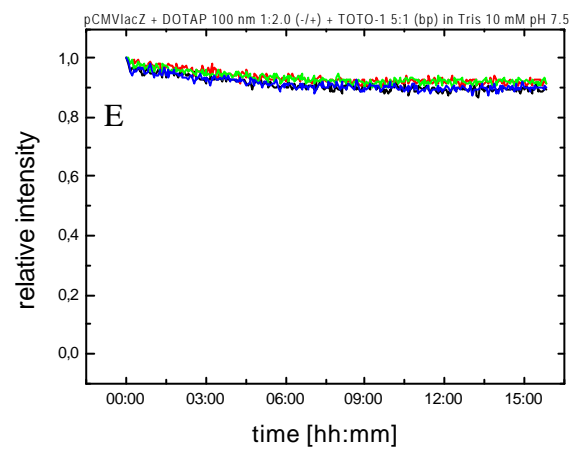
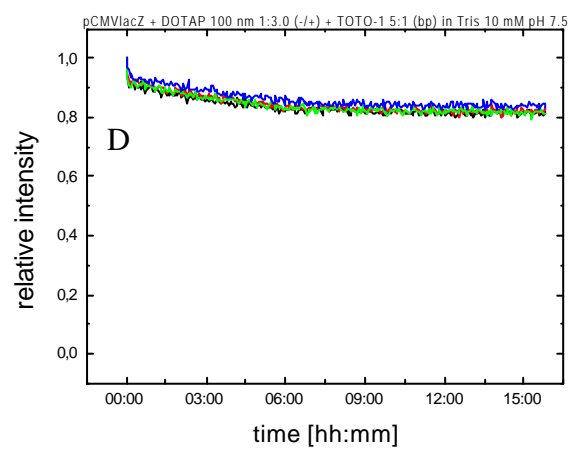
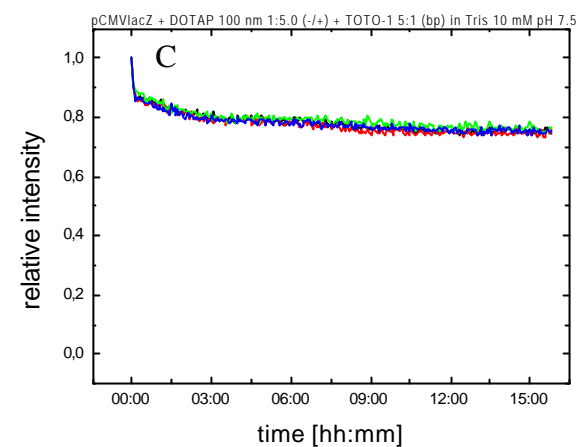
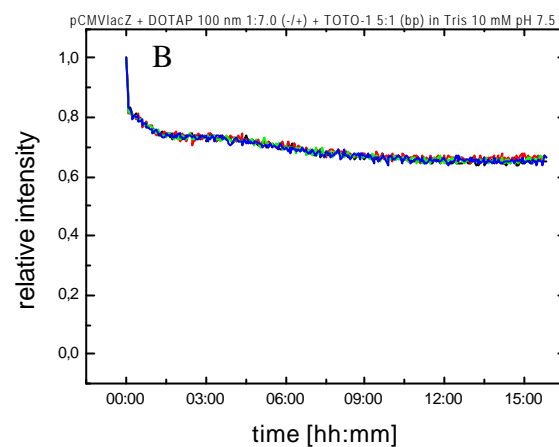
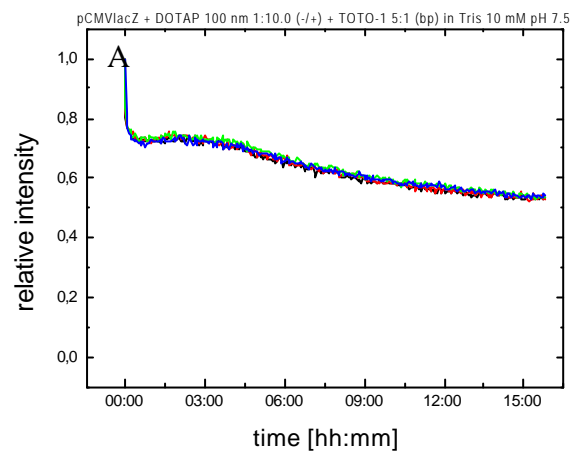
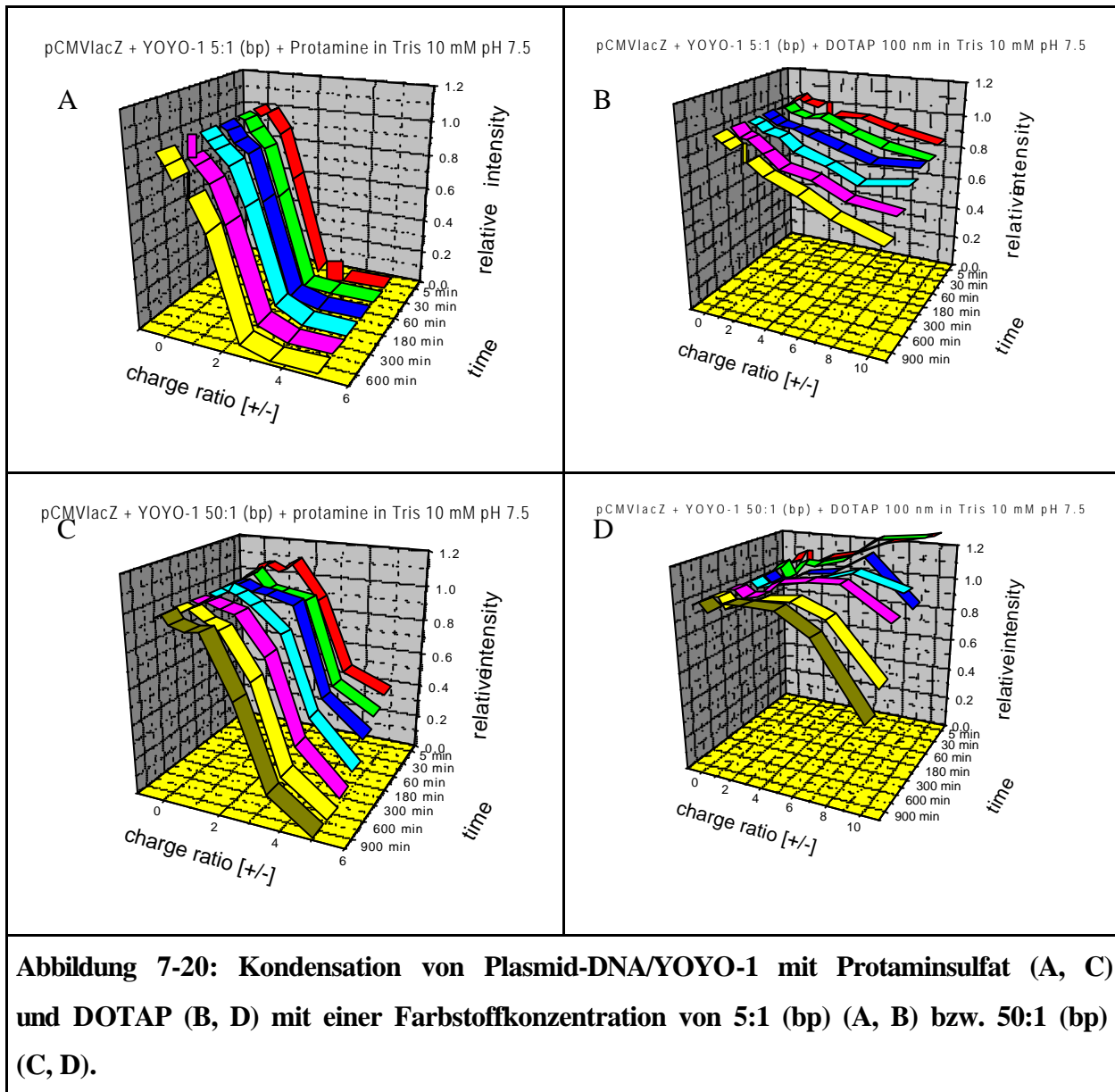


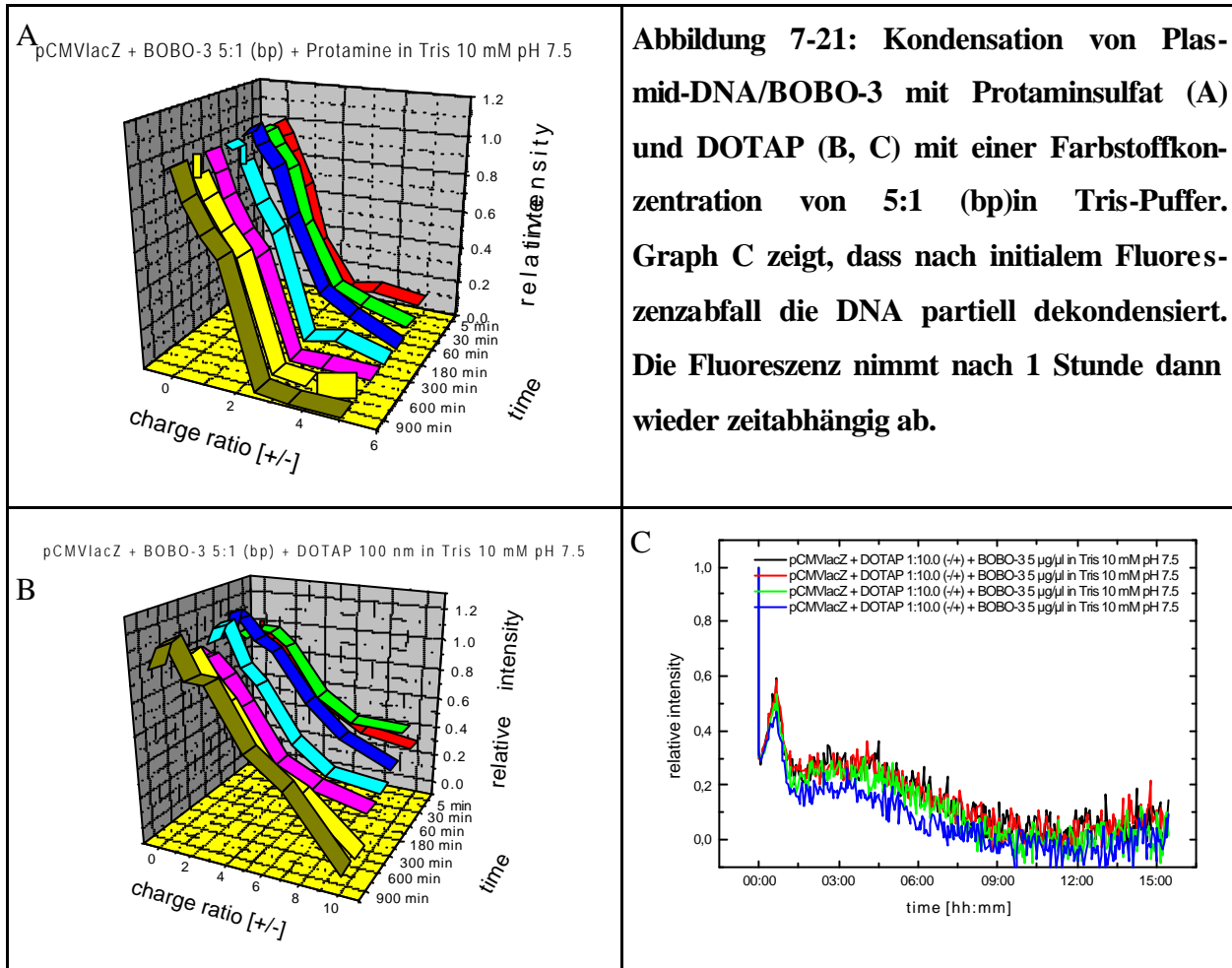
Abbildung 7-19: Einzelmessungen der Kinetik von Plasmid-DNA / TOTO-1 5:1 (bp) mit DOTAP-Liposomen. Die Graphen A bis H zeigen die zeitliche Änderung der relativen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom zugesetzten Ladungsverhältnis der kationischen Liposomen zur negativen Ladung der Plasmid-DNA: A) 10:1 (+/-), B) 7:1 (+/-), C) 5:1 (+/-), D) 3:1 (+/-), E) 2:1 (+/-), F) 1:1 (+/-), G) 0,5:1 (+/-) und H) 0:1 (+/-). Es sind in A) bis G) jeweils 4 individuelle Messungen dargestellt, in H) 8 Einzelmessungen. Die Einzelmessungen zeigen die gute Reproduzierbarkeit der Methode. Kationische Komplexe kondensieren DNA innerhalb von 30 Minuten auf einen Minimalwert, der sich während der untersuchten Inkubationszeit von 15 Stunden kaum ändert. Das Ausmaß der Kondensation nimmt mit reduziertem (+/-)-Ladungsverhältnis ab (A - D). Komplexe mit einem geringen Überschuß kationischer Ladung (E), neutrale Komplexe (F) und negativ geladenen Komplexe (G) zeigen keine Abnahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Wird **YOYO-1**-(5:1(bp))-markierte Plasmid-DNA mit *Protaminsulfat* kondensiert (Abbildung 7-20), so ist kein zeitabhängiger Unterschied zwischen den einzelnen Messungen erkennbar. YOYO-1-Markierung zeigt mit Protaminsulfat ein kooperatives Bindungsverhalten. *DOTAP* ist nicht fähig, den Fluoreszenzfarbstoff aus der Bindung mit der DNA vollständig zu verdrängen. Negativ geladene Komplexe mit kurzer Inkubationszeit zeigen nur eine sehr schwache DNA-Kondensation. Die Abnahme der Fluoreszenz ist zeitabhängig. Nach 5 minütiger Inkubation beträgt die Fluoreszenzintensität bei einem Ladungsverhältnis von 10:1 (+/-) 77 %, und sinkt nach 15 Stunden weiter auf 54 % ab. Die Bindung ist wenig kooperativ.

Wird die Farbstoffmenge von 5:1 (bp) auf 50:1 (bp) verringert, so ist für *Protaminsulfat* eine zeitabhängige Abnahme der Fluoreszenzintensität meßbar. Erst nach einer Inkubationszeit von 300 Minuten wird bei einem Ladungsverhältnis von 5:1 (+/-) die Basislinie erreicht. Die Kondensation der Plasmid-DNA bei einer Farbstoffkonzentration von 50:1 (bp) führt mit *DOTAP*-Liposomen zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität bei Erhöhung der DOTAP-Menge. Wird die Inkubationszeit der Komplexe erhöht, so nimmt die Fluoreszenzintensität wieder ab, so dass auch YOYO-1 ein Farbstoff ist, der kinetische Effekte bei der Nukleinsäurekondensation diskriminieren kann, wenn die Farbstoffkonzentration auf 50:1 (bp) reduziert wird.



Wird die DNA mit **BOBO-3** markiert, erfolgt mit *Protaminsulfat* eine zeitabhängige Kondensation. Nach 30 Minuten ist bei einem Ladungsverhältnis von 5:1 (+/-) die Kondensation vollständig. Bei einem Ladungsverhältnis von 2,5:1 (+/-) ist nach 3 Stunden die Kondensation vollständig (Abbildung 7-21 A). Negativ geladene *DOTAP*-Komplexe führen zu einem Fluoreszenzanstieg. Die Kondensation der kationischen Komplexe ist zeitabhängig. Kationische Komplexe zeigen nach 30 Minuten einen Fluoreszenzanstieg. Anschließend fällt die Fluoreszenz wieder langsam ab, um bei einem Ladungsverhältnis von 10:1 (+/-) die Basislinie zu erreichen (Abbildung 7-21 B, C).



In Abbildung 7-22 ist die Komplexierung von pCMVlacZ mit Protaminsulfat und DOTAP unter Verwendung von **POPO-3** als Fluoreszenzfarbstoff dargestellt. Während *Protaminsulfat* kooperativ und zeitunabhängig bindet, ist bei *DOTAP*-Komplexierung bei negativ geladenen Komplexen ein Fluoreszenzanstieg messbar. Nach 2 Stunden nimmt die relative Fluoreszenz in Abhängigkeit vom zugesetzten Ladungsverhältnis linear ab.

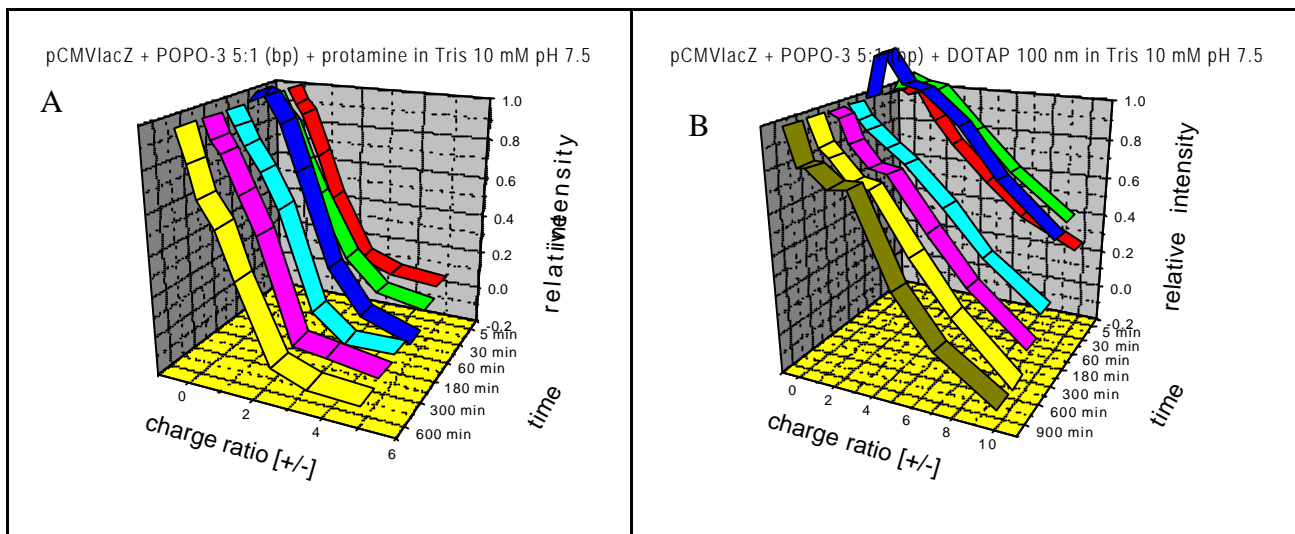
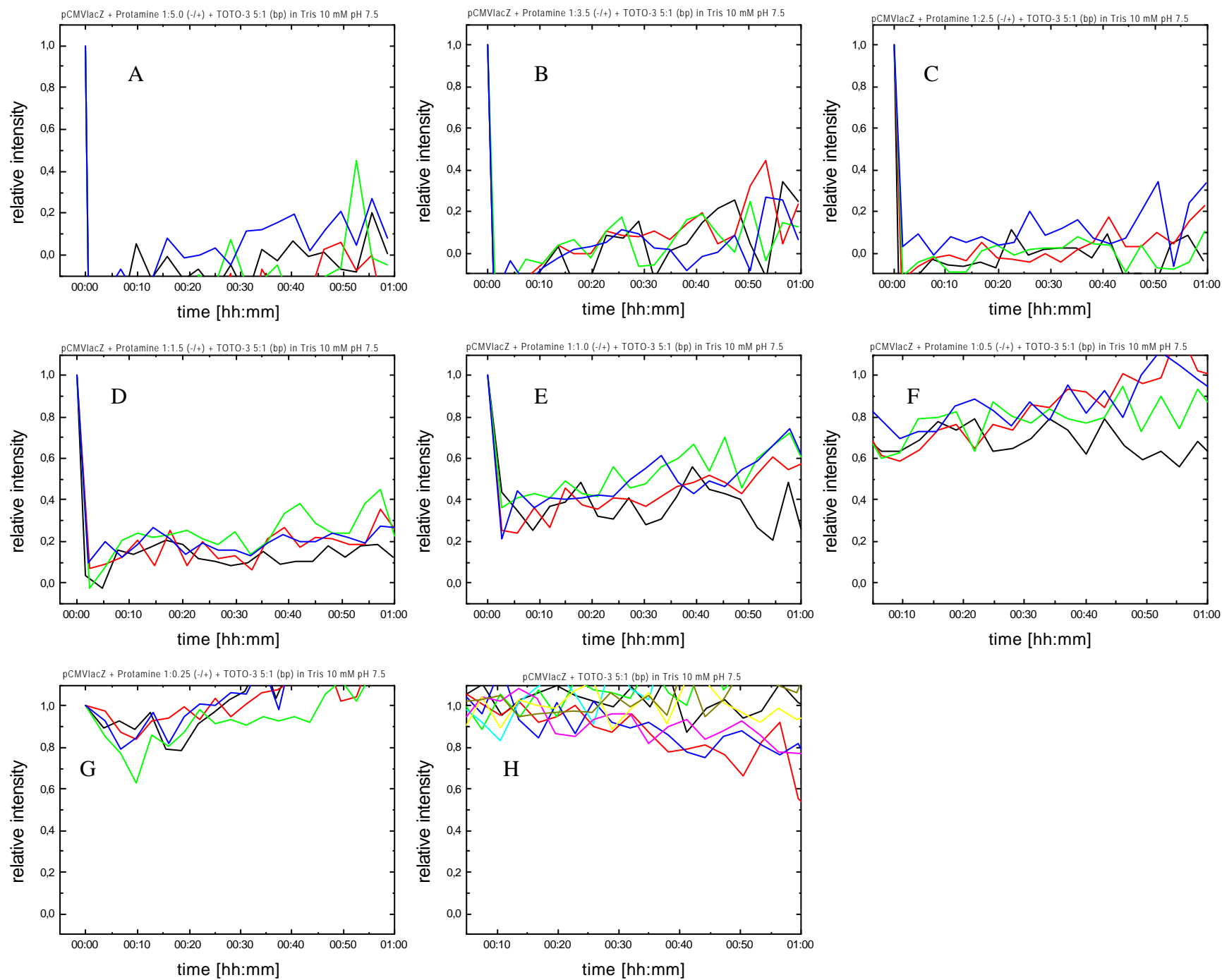


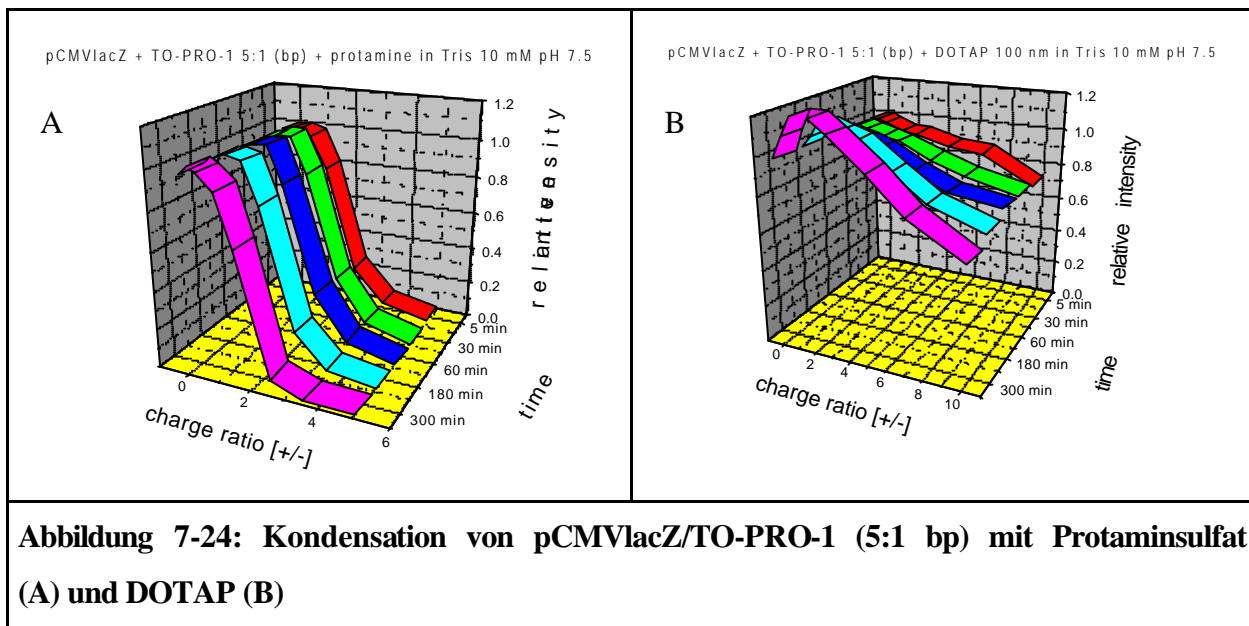
Abbildung 7-22: Kondensation von Plasmid-DNA/POPO-3 (5:1 (bp)) mit Protaminsulfat (A) und DOTAP (B)

Die Fluoreszenzintensität der **TOTO-3** – markierten Komplexe ist gering. Dadurch ist die Streuung der Einzelwerte zu groß, um die Kondensation quantitativ erfassen zu können. Die kurzzeitige Kondensation von Plasmid-DNA ist aber mit **TOTO-3** darstellbar (Abbildung 7-23).

Abbildung 7-23: Einzelmessungen der Kinetik von Plasmid-DNA / TOTO-3 5:1 (bp) mit Protaminsulfat. Die Graphen A bis H zeigen die zeitliche Änderung der relativen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom zugesetzten Ladungsverhältnis der kationischen Liposomen zur negativen Ladung der Plasmid-DNA: A) 5:1 (+/-), B) 3,5:1 (+/-), C) 2,5:1 (+/-), D) 1,5:1 (+/-), E) 1:1 (+/-), F) 0,5:1 (+/-), G) 0,25:1 (+/-) und H) 0:1 (+/-). Es sind in A) bis G) jeweils 4 individuelle Messungen dargestellt, in H) 8 Einzelmessungen. Die starke Streuung der Einzelmessung und das Ausbleichen innerhalb von 60 Minuten zeigen, dass TOTO-3 für die Messung der Kondensation von Nukleinsäuren nicht geeignet ist.



TO-PRO-1-markierte Plasmid-DNA ist mit *Protaminsulfat* innerhalb von 5 Minuten kondensierbar. Die relative Intensität von negativ geladenen Komplexen und schwach positiv geladenen Komplexen nimmt über einen Zeitraum von 6 Stunden ab. Bei Komplexen mit einem hohen Überschuß kationischer Ladung nimmt die Intensität innerhalb von 5 Minuten ein minimales Niveau an und verändert sich über 6 Stunden nicht mehr. Wird die DNA mit *DOTAP* kondensiert, so erfolgt bei negativ geladenen Komplexen ein Fluoreszenzanstieg über einen Zeitraum von 6 Stunden. Dabei wird auch das Niveau der reinen DNA überschritten. Die Intensität kationischer Komplexe nimmt mit zunehmenden Ladungsverhältnis und zunehmender Inkubationszeit ab.



Mit dem Fluoreszenzfarbstoff **YO-PRO-1** sind 4 verschiedene Farbstoffkonzentrationen untersucht worden. Bei einer Farbstoffkonzentration von 1:1 (bp) zeigt *Protaminsulfat* ein kooperatives Bindungsverhalten. Die Fluoreszenzintensität ist über einen Zeitraum von 15 Stunden fast konstant, während *DOTAP*-Komplexierung zu einer kontinuierlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität mit zunehmendem Ladungsverhältnis (+/-) und zunehmender Inkubationszeit führt. Die Kooperativität ist geringer als bei Protaminkondensierung. Wird die Farbstoffkonzentration auf 5:1 (bp) vermindert, erfolgt mit Protaminsulfat wiederum kooperative Bindung zu allen Inkubationszeiten, wobei sich im Verlauf über 15 Stunden die relativen Intensitäten nur wenig ändern. *DOTAP*-Komplexierung führt wiederum zu einer verminderten Kooperativität im Vergleich zur Protaminkondensierung. Die Zeitabhängigkeit zeigt eine Kondensation, die über 15 Stunden bei hohen Ladungsverhältnissen zu einer ständigen Fluoreszenzabnahme führt. Wird eine Farbstoffkonzentration von 10:1 (bp) verwendet, so nimmt die Fluoreszenz bei Protaminkondensierung zeitabhängig ab.

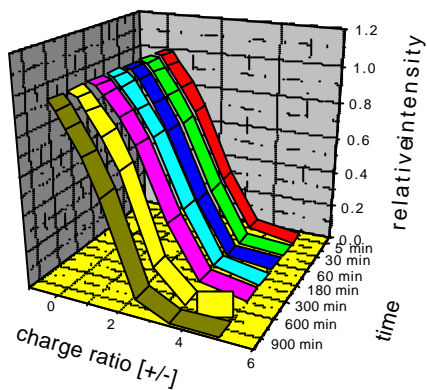
Der Fluoreszenzanstieg bei einem Ladungsverhältnis von 3,5 (+/-) ist nur durch einen systematischen Meßfehler erklärbar. Bei DOTAP-komplexierter Plasmid-DNA ist nach 5 Minuten der Kondensationsvorgang noch nicht abgeschlossen. Innerhalb von 60 Minuten nimmt die Fluoreszenz nur gering ab. Nach 2 Stunden erfolgt dann eine kontinuierliche Fluoreszenzabnahme der kationisch geladenen Komplexe. Bei den negativ geladenen Komplexen nimmt die Fluoreszenz über den Zeitraum von 15 Stunden leicht zu. Wird die Farbstoffkonzentration weiter verringert auf 50:1 (bp), so erfolgt mit Protaminsulfat wiederum eine schnelle Fluoreszenzabnahme, die zeitlich fast konstant bleibt. DOTAP-Kondensation ist wieder zeitkontrolliert mit Fluoreszenzabnahme der kationischen Komplexe und Fluoreszenzzunahme negativ geladener Komplexe. Insgesamt ist die Streuung der Einzelmessungen bei einer Farbstoffkonzentration von 50:1 (bp) größer als bei Proben mit einer höheren Konzentration des Farbstoffes.

In Abbildung 7-26 ist dargestellt, dass die Kondensation mit DOTAP in 2 Stufen verläuft. Bei Komplexen mit einem hohen Überschuß kationischer Ladung (10:1 (+/-) bis 5:1 (+/-)) folgt nach der primären schnellen Kondensationsphase eine Phase der Komplexreifung für die Dauer von 1 h, bei der die Intensität sich nur wenig ändert. Nach 1 Stunde nimmt die Fluoreszenzintensität weiter ab. Je größer der Überschuß der kationischen Ladung ist, desto schneller erfolgt die Fluoreszenzabnahme. Bei einem Ladungsverhältnis von 10:1 (+/-) wird nach 15stündiger Inkubation die Basislinie erreicht. Komplexe mit einem Ladungsverhältnis von 3:1 lassen sich mit Protaminsulfat nicht kondensieren.

Abbildung 7-25: Kondensation von Plasmid-DNA mit Protaminsulfat (A, C, E, G) und DOTAP (B, D, F, H) mit YO-PRO-1 als Fluoreszenzfarbstoff. Die Farbstoffkonzentration beträgt 1:1 (bp) (A, B), 1:5 (bp) (C, D), 1:10 (bp) (E, F) sowie 1:50 (bp) (G, H)

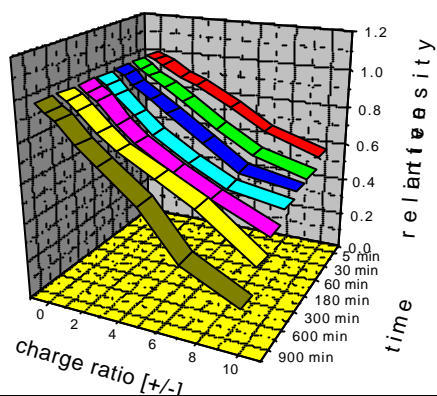
pCMVlacZ + YO-PRO-1 1:1 (bp) + protamine in Tris 10 mM pH 7.5

A



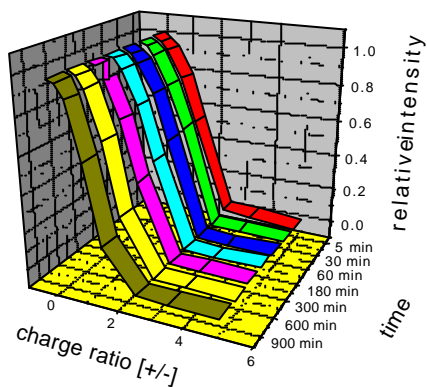
pCMVlacZ + YO-PRO-1 1:1 (bp) + DOTAP 100 nm in Tris 10 mM pH 7.5

B



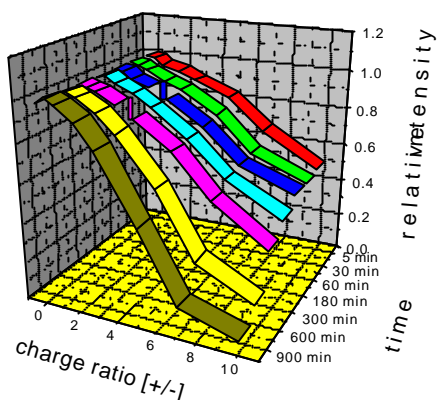
pCMVlacZ + YO-PRO-1 5:1 (bp) + protamine in Tris 10 mM pH 7.5

C



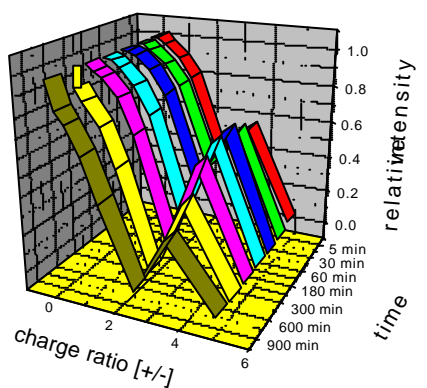
pCMVlacZ + YO-PRO-1 5:1 (bp) + DOTAP 100 nm in Tris 10 mM pH 7.5

D



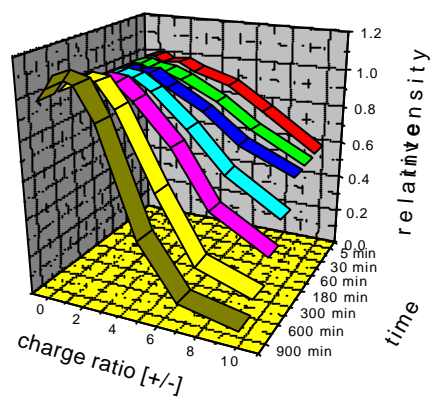
pCMVlacZ + YO-PRO-1 10:1 (bp) + protamine in Tris 10 mM pH 7.5

E



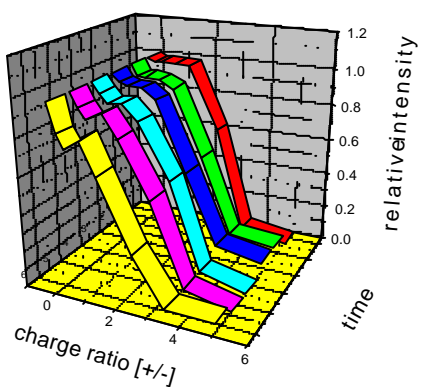
pCMVlacZ + YO-PRO-1 10:1 (bp) + DOTAP 100 nm in Tris 10 mM pH 7.5

F



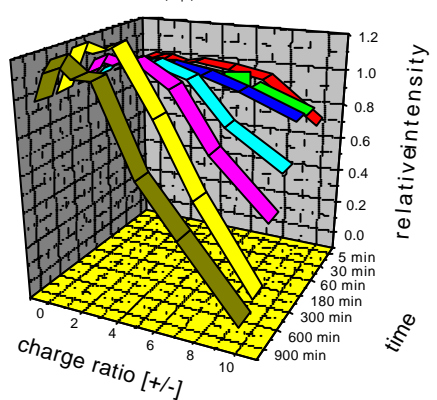
pCMVlacZ + YO-PRO-1 50:1 (bp) + protamine in Tris 10 mM pH 7.5

G



pCMVlacZ + YO-PRO-1 50:1 (bp) + DOTAP 100 nm in Tris 10 mM pH 7.5

H



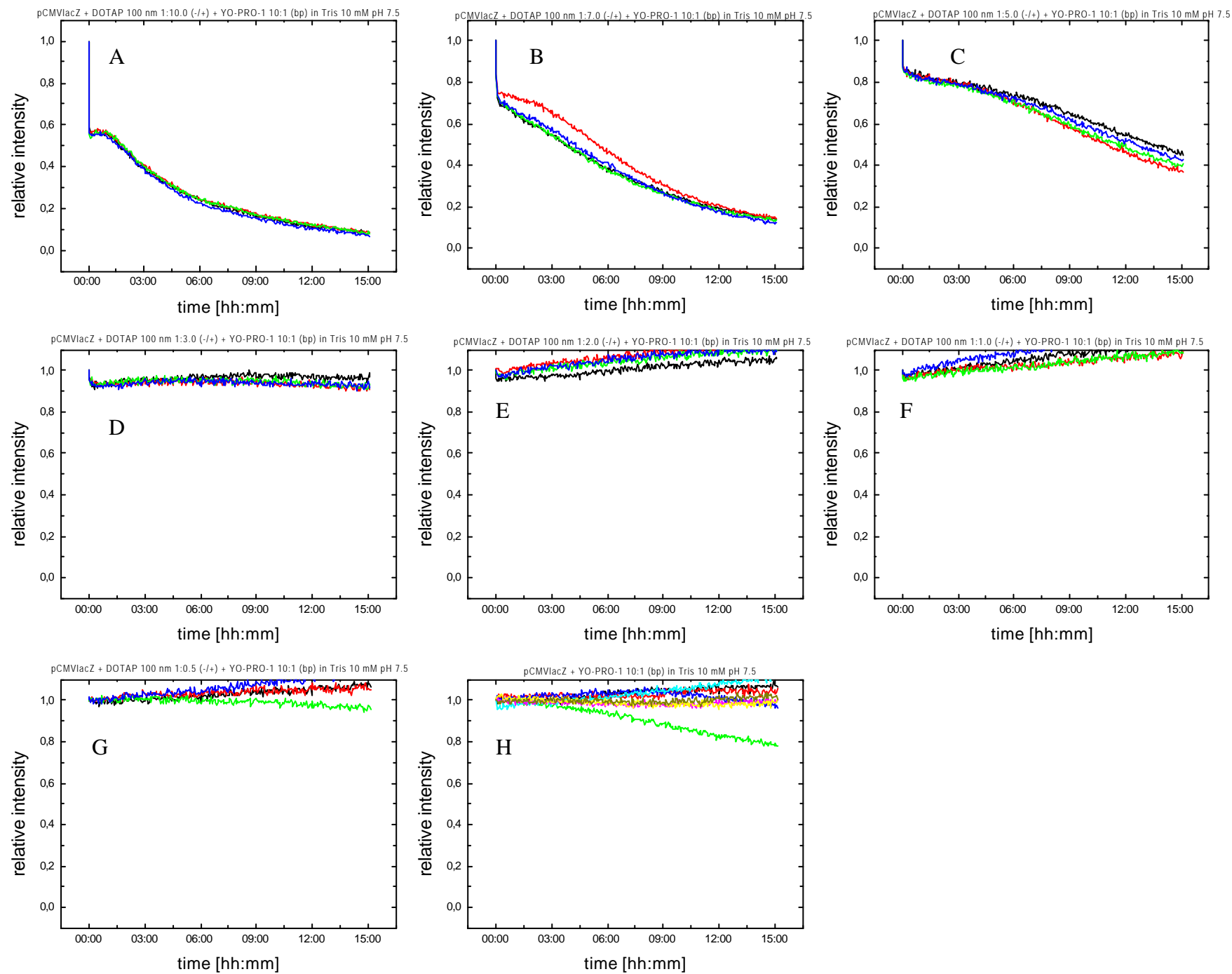


Abbildung 7-26: Kondensation von YO-PRO-1-markierter Plasmid-DNA mit DOTAP mit einer Farbstoffkonzentration von (10:1 (bp)).

Mit **TO-PRO-3** kann die Kondensation mit *Protaminsulfat* für einen Zeitraum von 60 Minuten gemessen werden. Während beim Protaminsulfat die Intensität mit zunehmendem Ladungsverhältnis abnimmt, ist bei *DOTAP*-Kondensation eine Fluoreszenzzunahme bei einem Ladungsverhältnis von 10:1 (+/-) nachweisbar (Abbildung 7-27).

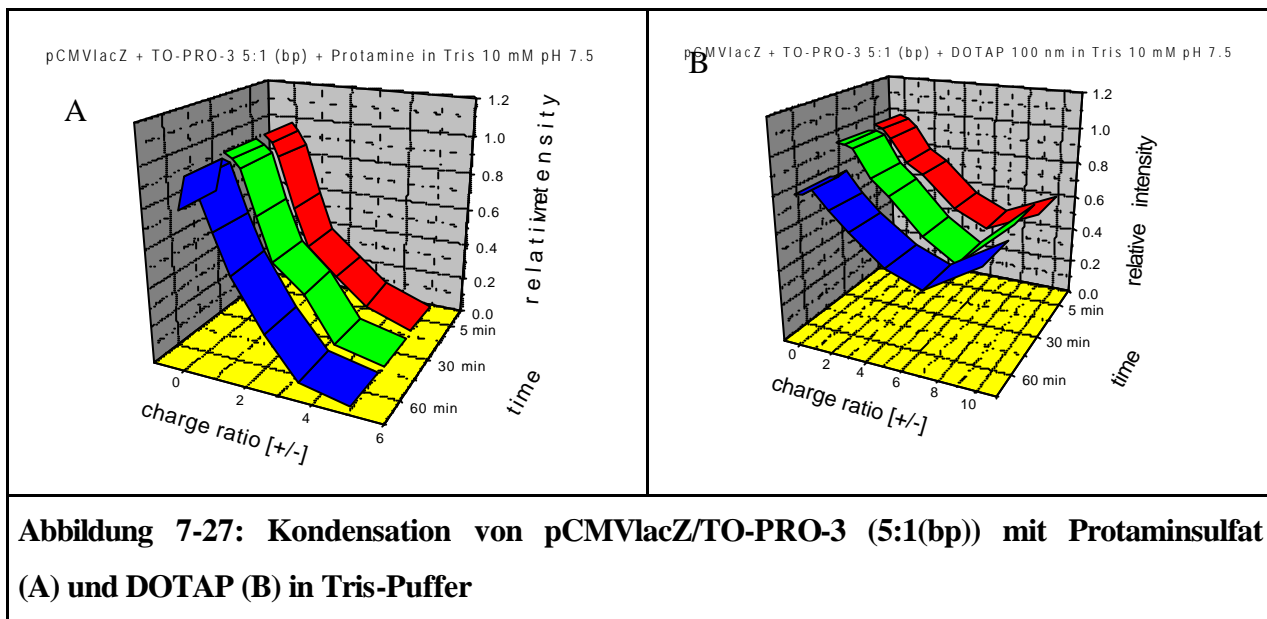
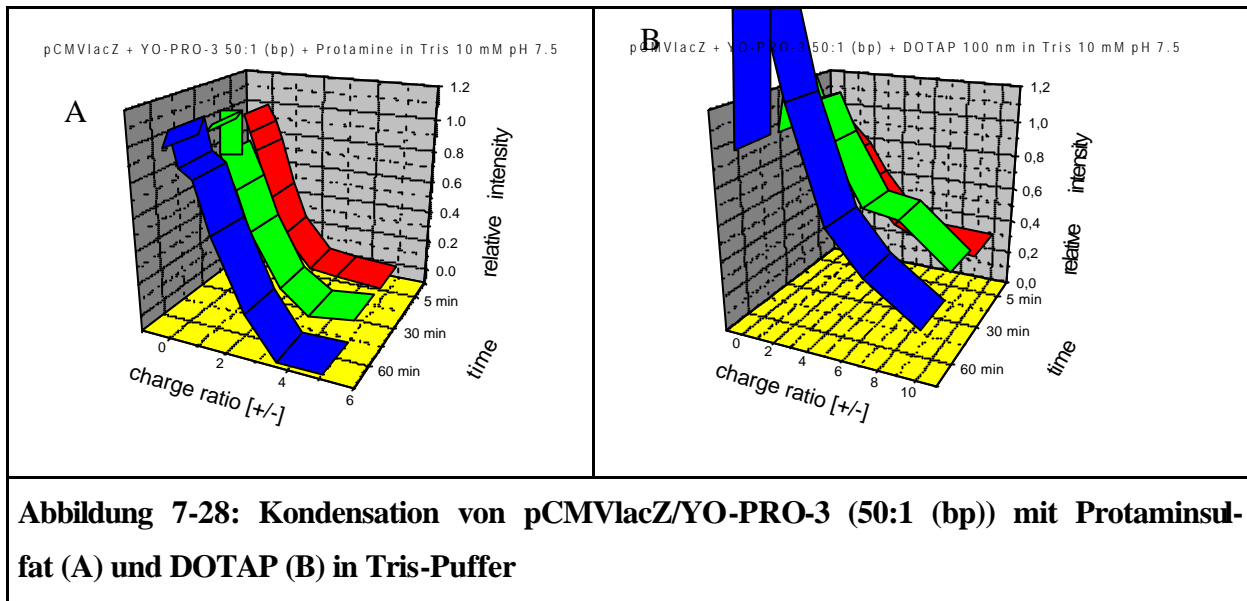


Abbildung 7-27: Kondensation von pCMVlacZ/TO-PRO-3 (5:1(bp)) mit Protaminsulfat (A) und DOTAP (B) in Tris-Puffer

YO-PRO-3-Markierung führt mit *Protamin* zu Kondensaten, die wegen des Ausbleichens nur über einen Zeitraum von 60 Minuten vermessen werden können. Kooperatives Bindungsverhalten ist auch hier messbar. *DOTAP*-Kondensation ist mit YO-PRO-3 praktisch nicht messbar, weil der Intensitätsunterschied zwischen DNA-Farbstoff-Addukt und Pufferwert zu gering ist und die Intensität der DNA-Kontrolle nach 60 Minuten fast schon dem Puffer angeglichen hat.



Die Daten zur Kondensation von Plasmid-DNA mit PicoGreen™ als Fluoreszenzfarbstoff sind unter 7.4 dargestellt.

7.4 Fluorimetrische Messung der DNA-Kondensation II: Charakterisierung von Genträgersystemen mit PicoGreen™-markierter Plasmid-DNA

Ergebnisse

In Abbildung 7-29 bis Abbildung 7-34 ist die Kondensation von Plasmid-DNA mit Protaminsulfat dargestellt. Die DNA-Kondensation verläuft in zwei Phasen. In der **Primärphase** erfolgt die schnelle Kondensation der DNA. Innerhalb von 15 Minuten ist die Primärphase der DNA-Kondensation abgeschlossen. In der **Sekundärphase** erfolgt die Komplexreifung.

Die Komplexe lassen sich in drei Gruppen einteilen:

vollständig kondensierte Komplexe (**Typ A**),

mittelstark kondensierte Komplexe (**Typ B**),

schwach kondensierte Komplexe (**Typ C**).

Das Ausmaß der Kondensation wird von der Art des verwendeten Puffers und dem Über-

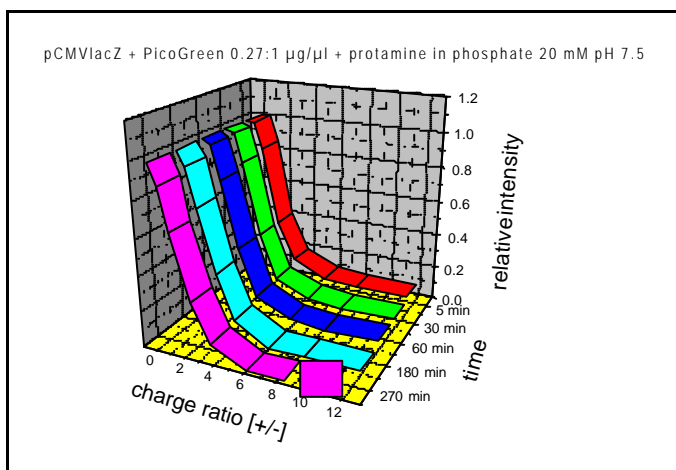


Abbildung 7-29: Kondensation von Plasmid-DNA mit Protaminsulfat in Phosphat-Puffer

schuß an kationischer Ladung bestimmt. Bei einem Ladungsverhältnis von größer 3,5:1 (+/-) (= Typ A) erfolgt eine sofortige (fast) vollständige Kondensation der Plasmid-DNA. In *P-Puffer* (s. Abbildung 7-33) erfolgt die Primärkondensation bis zu einer Restintensität, die von der zugesetzten Menge der kationischen Verbindung abhängt. In der Sekundärphase erfolgt eine lineare Abnahme der Fluoreszenz bis die Basislinie erreicht ist. Nach 4,5 Stunden ist in P-Puffer bei Komplexen mit hohem Ladungsüberschuß die Basis-

linie erreicht.

Wird ein Ladungsverhältnis von 1:1 bis 3,5:1 (+/-) in *P-Puffer* angewendet (*Typ B*), erfolgt eine Primärkondensation innerhalb von 15 Minuten. Das Ausmaß der Kondensation ist auch hier vom Ladungsverhältnis abhängig. Es erfolgt eine Kondensation auf bis zu 30 % RI. Die Komplextreifung erfolgt auch hier nach einer Kinetik 0. Ordnung, wobei aber innerhalb von 4,5 Stunden die Basislinie nicht erreicht wird.

Ein negativ geladener Komplex von Protaminsulfat mit Plasmid-DNA (= *Typ C*) zeigt keine Primärkondensation in *P-Puffer*. Innerhalb von 4 Stunden nimmt die Fluoreszenzintensität auf 80 – 90 % des Ausgangswertes ab.

Die Kontrolle aus Plasmid-DNA und PicoGreen™ zeigt eine nur geringe Streuung von 8 Einzelmessungen (s. Abbildung 7-15).

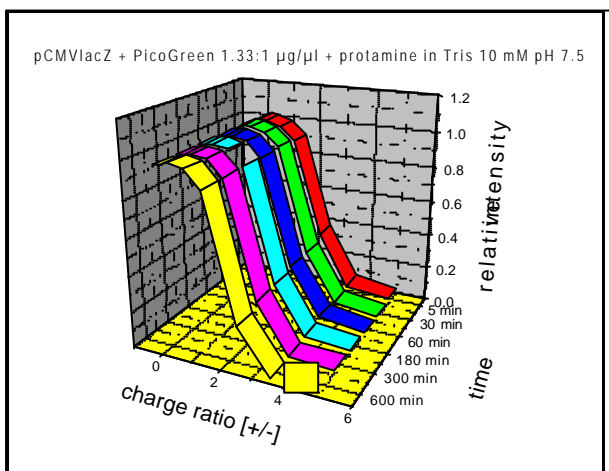


Abbildung 7-30: Kondensation von Plasmid-DNA mit Protaminsulfat in Tris-Puffer

Im Vergleich zur Kondensation in *P-Puffer* ist in *T-Puffer* die Primärphase dadurch gekennzeichnet, dass bei Komplexen vom *Typ A* eine Kondensation auf 10 % erfolgt. Die Komplextreifung zeigt eine Stabilität für 15 Stunden. Es ist keine Veränderung der Fluoreszenzintensität während der Komplextreifung messbar.

Kondensate vom *Typ B* in *T-Puffer* zeigen nach der Primärkondensation eine schwächere Abnahme der Fluoreszenzintensität als die Komplexe vom *Typ B* im Phosphat-Puffer.

Typ C-Komplexe in *T-Puffer* sind in diesem

Puffer bei einem neutralen oder negativen Ladungsverhältnis nicht kondensierbar. Die Komplexe sind über 15 Stunden stabil.

Die Sekundärphase ist dadurch gekennzeichnet, dass die Kondensations-Zeit-Kurven von unabhängigen Kondensationsexperimenten vom *Typ B* eine stärkere Abweichung der relativen Fluoreszenzintensität aufweisen. Unter den Bedingungen der vollständigen Kondensation (relative Intensität = 0; *Typ A*) bzw. der nichtkondensierenden Bedingungen (relative Intensität = 1; *Typ C*) ist die Streuung zwischen einzelnen unabhängigen Experimenten geringer (s. Abbildung 7-31).

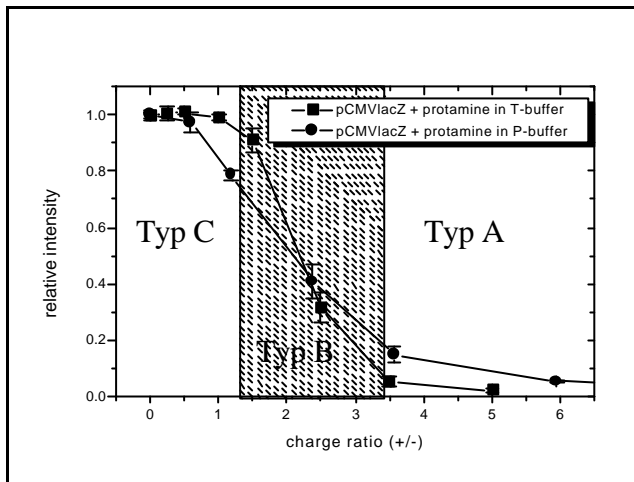


Abbildung 7-31: Kondensation von Plasmid-DNA mit Protamin nach 1 Stunde als 4fach-Bestimmungen mit PicoGreen™ als interkalierenden Farbstoff in T- und P-Puffer.

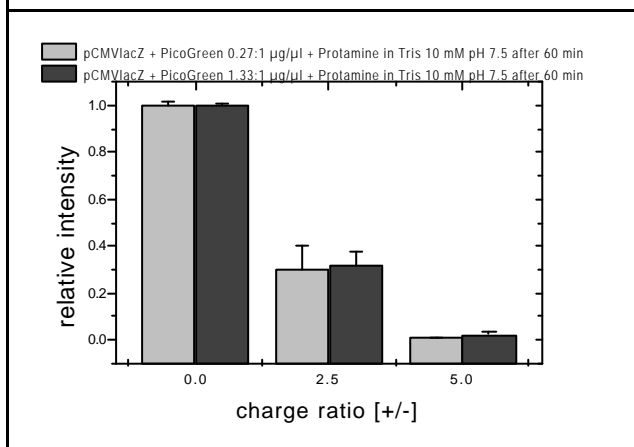
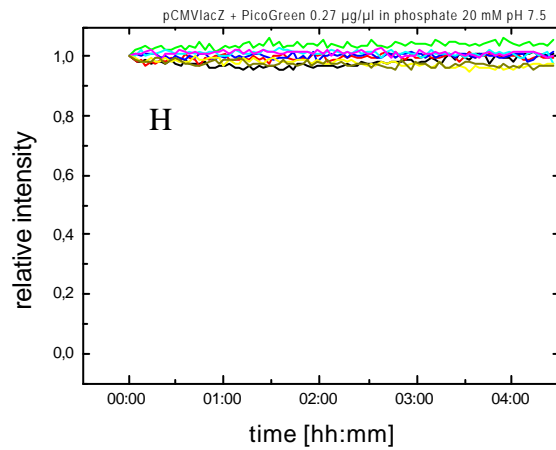
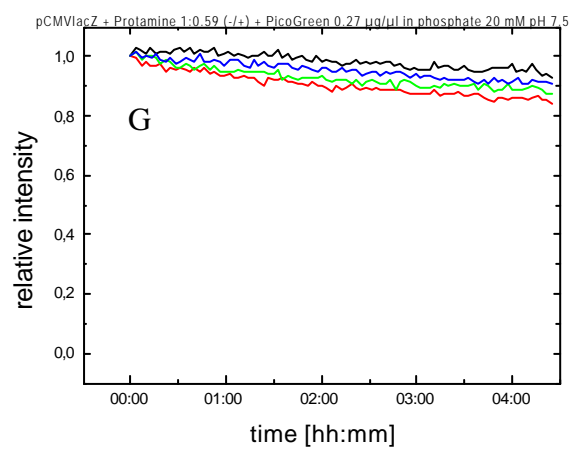
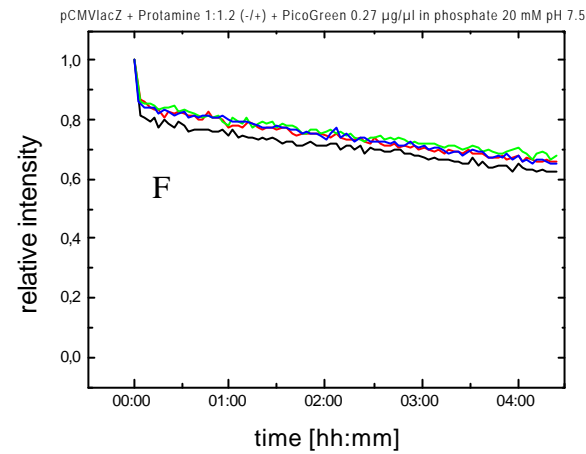
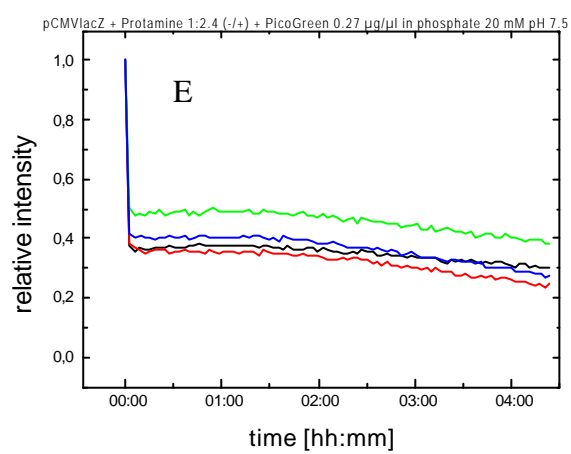
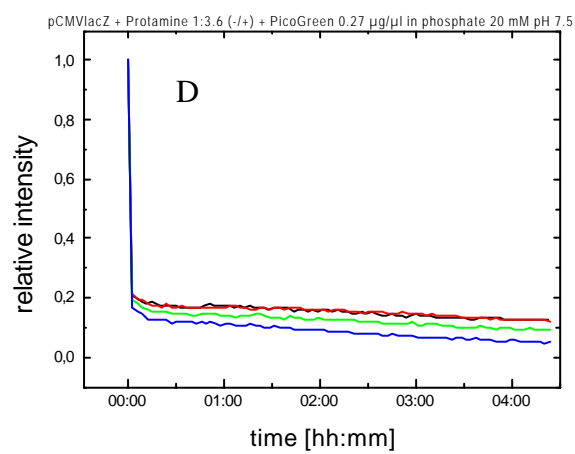
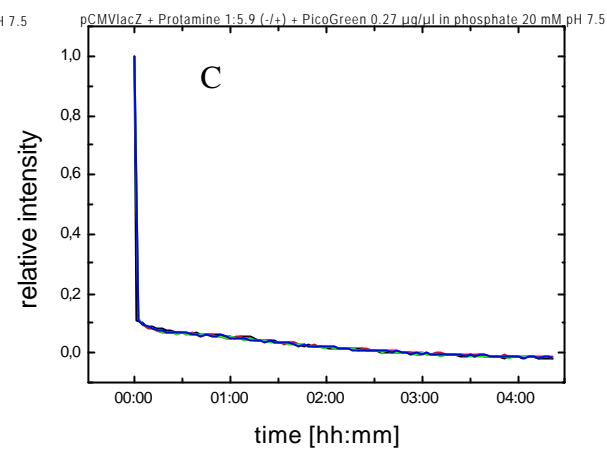
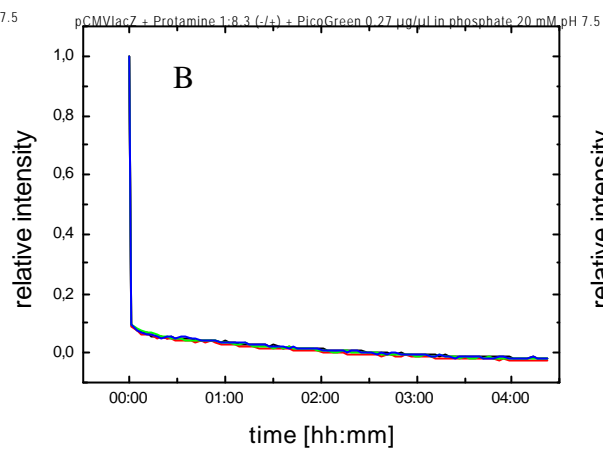
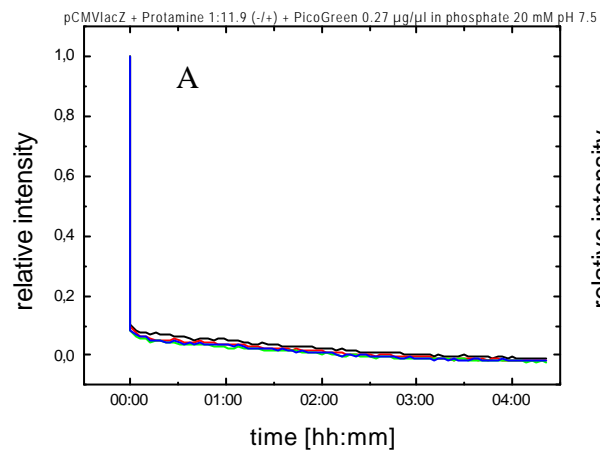


Abbildung 7-32: Einfluß der Konzentration von PicoGreen™ auf die Kondensation von Plasmid-DNA mit Protaminsulfat in T-Puffer

In dieser Abbildung ist die Titrationskurve von Plasmid-DNA mit Protaminsulfat in T- und P-Puffer dargestellt. Die linke weiße Fläche zeigt die Komplexe vom Typ C (schwache Kondensation), während die schraffierte Fläche teilkondensierte Komplexe darstellt (Typ B). Typ-A-Komplexe sind durch die weiße Fläche rechts charakterisiert.

In der Abbildung 7-32 ist die Abhängigkeit der DNA-Kondensation von der zugesetzten Farbstoffmenge dargestellt. Hier ist ebenfalls die Zunahme der Streuung unabhängiger Einzelmessungen von der zugesetzten Protaminmenge ersichtlich. Bei vollständig kondensierten Proben und nichtkondensierten Proben ist die Streuung der Einzelmessungen geringer als bei teilkondensierten Proben. Der Unterschied der relativen Intensitäten ist bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen nicht signifikant.

Abbildung 7-33: Kondensation von Plasmid-DNA mit Protaminsulfat in Phosphat-Puffer



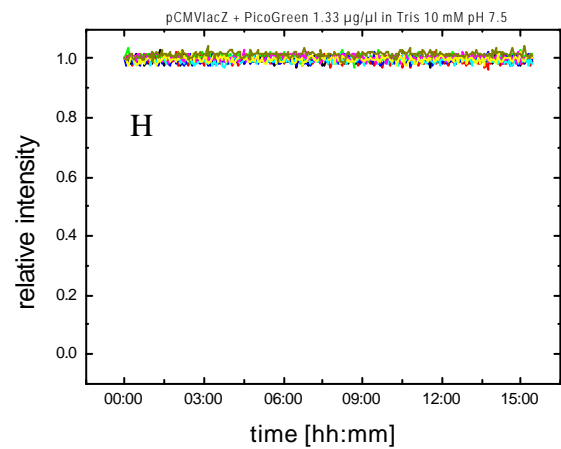
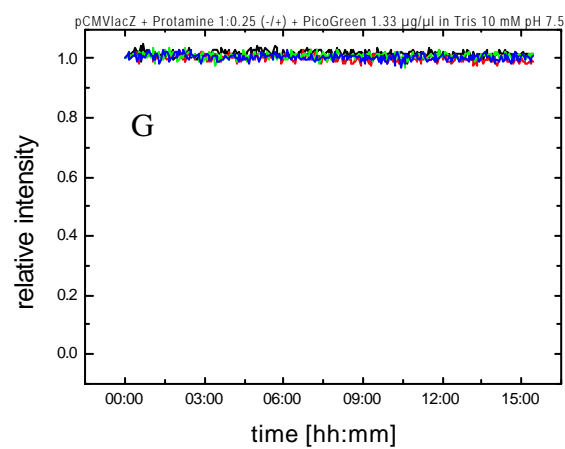
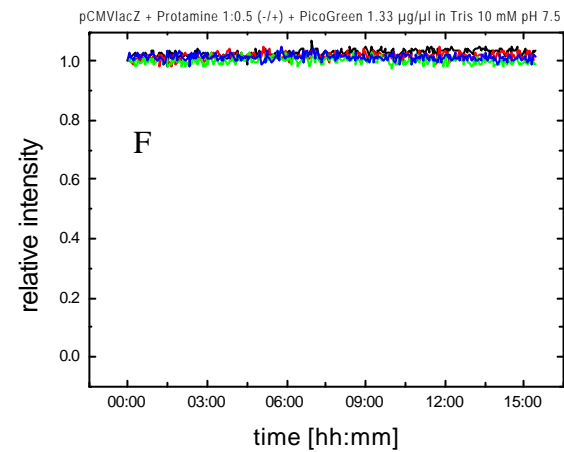
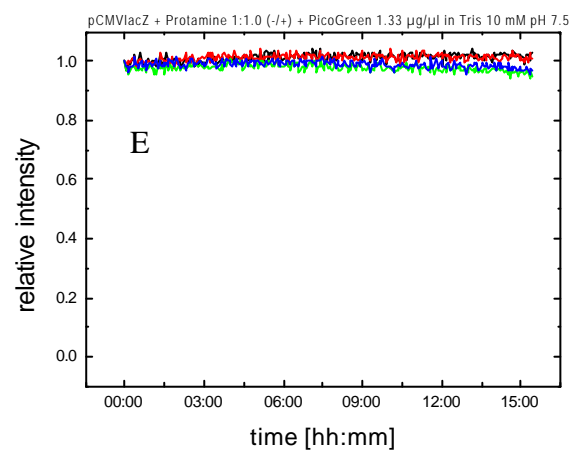
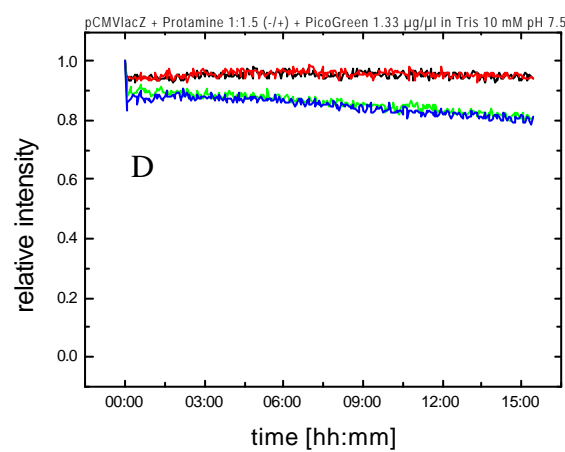
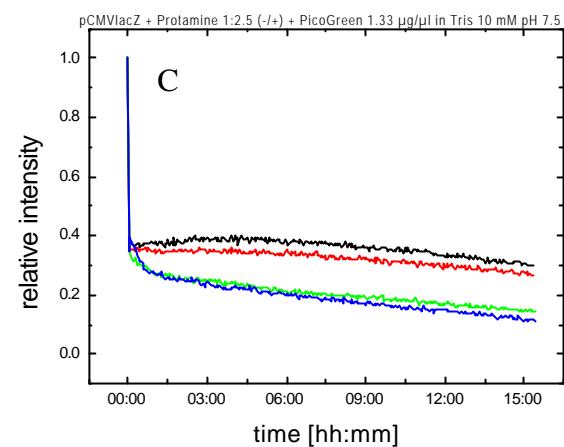
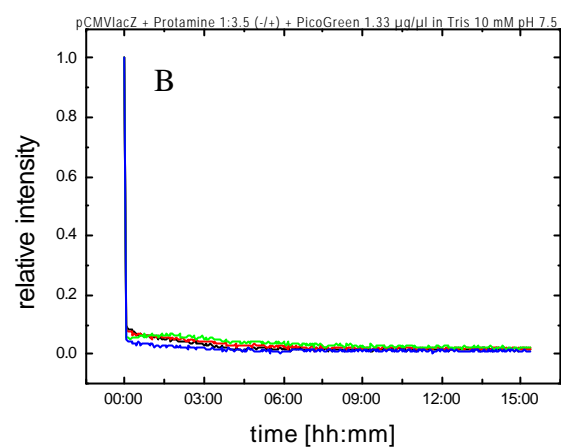
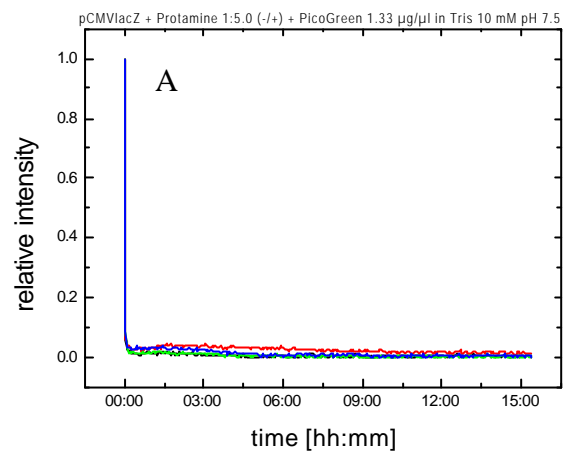


Abbildung 7-34: Kondensation von Plasmid-DNA mit Protaminsulfat in Tris-Puffer

Diskussion

Die Farbstoffe lassen sich aufgrund der Fluoreszenzausbeute (s. 7.1) in drei Gruppen einteilen:

1. Gruppe = Farbstoffe mit einer hohen Effizienz.

Diese Farbstoffe sind dadurch gekennzeichnet, dass die Fluoreszenzintensität der markierten Nukleinsäuren durch Minimieren des Emissionspalts beim vorhandenen Gerät (PerkinElmer LS 50 B) begrenzt werden muß, um nicht die obere Meßgrenze des Gerätes zu überschreiten. In diese Gruppe gehören die Farbstoffe

- YOYO-1
- BOBO-1
- POPO-1
- TOTO-1
- PO-PRO-3

2. Gruppe = Farbstoffe mit einer guten Effizienz

Diese Farbstoffe sind dadurch gekennzeichnet, dass bei einem Anregungspalt von 2.5 nm und dem maximalen Emissionspalt von 20 nm (LS 50 B) bei einer ausreichenden Auflösung der Excitations- und Emissionspektren ausreichende Fluoreszenzintensität vorliegt. Es muß aber, um die Maximalintensität von 1000 Geräte-Einheiten zu erreichen über die DNA-Menge eingestellt werden, wobei eine Ausgangsintensität von mindestens 200 Einheiten erforderlich ist, um in folgenden Experimenten die Kondensation von Nukleinsäuren zu bestimmen. Die Farbstoffe dieser Gruppe sind

- BOBO-3
- POPO-3
- BO-PRO-1
- TO-PRO-1
- YO-PRO-1

3. Gruppe = Farbstoffe mit einer geringen Effizienz

Diese Farbstoffe können nicht bei einer Anregung mit 2.5 nm-Spalt sowie 20 nm Emissionspalt (LS 50 B) vermessen werden, weil dann die Intensität im Emissionsmaximum zu gering ist. Um die Intensität zu steigern, muß die DNA-Menge beträchtlich erhöht werden, so dass diese Farb-

stoffe für die Interkalationsstudien ungeeignet sind. Sie können aber bei einzelnen Kondensationsmessungen mit großen DNA-Mengen eingesetzt werden. Diese Farbstoffe sind

- YOYO-3
- PO-PRO-1
- BO-PRO-3
- TO-PRO-3
- YO-PRO-3

4. Gruppe = keine Intensität meßbar

- TOTO-3

Die DNA-Komplexe der dimeren Fluoreszenzfarbstoffe der "-1-Serien" zeigen eine hohe Fluoreszenzintensität, die "-1-Serien" der monomeren Fluoreszenzfarbstoffe (BO-PRO-Serie) sind mittelmäßig empfindlich, während die "-3er-Serien" der monomeren Farbstoffe eine geringe Fluoreszenzintensität in den DNA-Komplexen aufweisen. Die dimeren Farbstoffe (BOBO-Serie) der "3er-Serien" sind zu den mittel- bis wenigsensitiven Farbstoffen einzuordnen.

Zur Erhöhung der Fluoreszenzintensität muß entweder die DNA-Menge erhöht werden oder das Farbstoff:DNA-Verhältnis erhöht werden. Eine Erhöhung der DNA-Menge soll nur soweit erfolgen, dass die Kondensationsexperimente in dem Konzentrationsbereich durchgeführt werden, in dem auch Transfektionen in der Zellkultur durchgeführt werden. Das DNA:Farbstoffverhältnis wird auch nicht verändert, weil die Farbstoffe selber kationische Verbindungen sind und damit auch potentiell einen kondensierenden Einfluß auf die DNA haben können. Durch Titration von DNA mit Ethidiumbromid kann Plasmid-DNA von der überdrillten ("supercoiled")-Konformation in die lineare Konformation und bei weiterer Zugabe der interkalierenden Verbindung sogar in einen invers-überdrillten ("invers-supercoiled") Zustand überführt werden [135]. Ethidiumbromid ist eine monokationische Verbindung. Die meisten der verwendeten interkalierenden Farbstoffe sind zweifach oder vierfach kationisch geladene Moleküle. Oligokationische Moleküle wie Ca^{2+} , La^{3+} [116] oder Lipospermin [82] kondensieren DNA effektiver als monokationische Verbindungen.

Die DNA-Farbstoffkomplexe, die unter den geforderten Bedingungen ausreichend Fluoreszenzlicht emittieren (s. 7.1), sind hinsichtlich ihres Ausbleichverhalten untersucht worden (s. 7.2). Stabilitätsanforderungen, die für ein ausreichendes Ausbleichverhalten gestellt werden, sind:

- Maximal 70 % Ausbleichen
- Keine starke Streuung von 8 individuellen Einzelmessungen (max. 10 %).

Die Farbstoffe lassen sich aufgrund des kinetischen Ausbleichverhaltens einteilen in

1. **geeignete Farbstoffe für Langzeitkondensationsuntersuchungen**

- Ethidiumhomodimer-2
- TOTO-1
- YOYO-1
- YO-PRO-1
- PicoGreen™

2. **Farbstoffe, die wegen des schnellen Ausbleichens nicht für Kinetikmessungen geeignet sind, aber für die kurzzeitige Messung der Kondensation von Nukleinsäuren verwendet werden können**

- Acridinorange: 5 Stunden
- BO-PRO-3: 7 Stunden
- BOBO-3: 1 Stunde
- POPO-3: 1 Stunde
- TO-PRO-1: 8 Stunden (4,5 Stunden wegen Streuung)
- TO-PRO-3: 1 Stunden
- TOTO-3: 1 Stunde
- YO-PRO-3: 1 Stunde

3. **Farbstoffe, die wegen der starken Streuung individueller Messungen nicht geeignet sind**

- Ethidiumbromid
- TO-PRO-1 (nach 4,5 Stunden)

Ethidiumbromid ist der bekannteste DNA-Farbstoff, der für DNA-Gehaltsbestimmungen [133], Färben von DNA-Banden im Elektrophoresegel oder zur Konformationsbestimmung von Nukleinsäuren [135] oder fluorimetrischen Messung der Kondensation [117] eingesetzt wird. Insbesondere die Eigenschaft von Ethidiumbromid überdrillte DNA zu entspannen und sogar in eine invers-verdrillte Form überführen zu können, ist ein Nachteil für die Verwendung von EB für Kondensationsmessungen.

AO zeigt für DNA und RNA-Basen unterschiedliche Emissionsmaxima [136], so dass eine Diskriminierung von RNA und DNA in Nukleinsäuregemischen möglich sein kann. Für gemischte RNA:DNA-Systeme kann somit eine parallele Verfolgung der Kondensationskinetik für den RNA-Anteil und den DNA-Anteil möglich sein. Allerdings ist das Ausbleichen des Farbstoffs zu stark, dass unter den verwendeten Messbedingungen eine analytische Aussage maximal für einen Zeit-

raum von drei Stunden möglich ist. Eine Zugabe von Reagentien, die ein Ausbleichen der Komplexe verhindern (DABCO, AntiFading™, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) kann das Ausbleichen verhindern. Der Einfluß der zugesetzten Verbindungen auf das Kondensationsverhalten ist bisher nicht untersucht.

Die Streuung von **YO-PRO-1** - Plasmid-DNA - Komplexen ist von der Farbstoffmenge abhängig. Je mehr Farbstoff zugesetzt wird, desto stabiler ist das Fluoreszenzsignal und desto geringer ist die Streuung von Einzelmessungen. Bei einer Farbstoffkonzentration von 1:1 und 5:1 (bp) ist der Farbstoff im Überschuß vorhanden. Bleicht der in der DNA interkalierte Farbstoff durch den Einfluß von Licht aus, kann freier Farbstoff aus der Lösung in den DNA-Strang nachdiffundieren. Das Fluoreszenzsignal ist konstant. Ist der Farbstoff in einer Konzentration von 10:1 (bp) oder 50:1 (bp) zugesetzt, so ist kein freier Farbstoff in der Lösung mehr vorhanden und der ausgebleichene Farbstoff wird nicht durch freien, überschüssigen Farbstoff aus der Lösung ersetzt, so dass die Intensität des Fluoreszenzsignals abnimmt.

PicoGreen™ ist der Farbstoff, der für Kondensationsmessungen am günstigsten ist, weil

1. das Fluoreszenzsignal über 15 Stunden stabil ist,
2. die Streuung von 8 Einzelmessungen der Stabilität des Fluoreszenzsignals sowohl in Phosphat- als auch in Tris-Puffer minimal ist und in den untersuchten Konzentrationsbereichen nur wenig von der zugesetzten Farbstoffmenge abhängt,
3. PicoGreen™ in wässriger Lösung keine Eigenfluoreszenz aufweist und
4. PicoGreen™ im Konzentrationsbereich von 25 pg / ml bis 1 µg / ml DNA ein lineares Fluoreszenzsignal ergibt.

Zum anderen sind die DNA-Farbstoffkomplexe, bei denen ein starkes Ausbleichen gemessen wird, ebenfalls ungeeignet. Die Messung des Kondensationseffekts kann dann nicht mehr vom Ausbleicheffekt unterschieden werden. Ein Ausbleichen des Farbstoff-DNA-Komplexes um 30 % (= 70 % Restintensität) wird toleriert, ein weiteres Ausbleichen des Komplexes führt dazu, dass der Signalunterschied zwischen DNA-Kontrolle und Kondensationsmessung zu gering wird, um ein auswertbares Messsignal zu erhalten. Bei einem geringen Intensitätsunterschied zwischen Puffer und DNA-Farbstoffkomplex (< 100) ist ein Ausbleichen um maximal 50 % tolerierbar, weil sonst die Streuung der Einzelmessungen zu groß wird.

Zur Untersuchung des Einflusses des Nukleinsäurefarbstoffes auf die DNA-Kondensation sind verschiedene Farbstoffe verglichen worden. Die Kondensation erfolgt sowohl mit Protaminsulfat als auch mit DOTAP-Liposomen.

Durch systematische Variation von

- Art des Fluoreszenzfarbstoffes

- Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes
- Art der kationischen Verbindung (Protaminsulfat, DOTAP)
- Konzentration der kationischen Verbindung (Ladungsverhältnis (+/-))
- Inkubationszeit

konnte gezeigt werden, dass die Kondensation von Plasmid-DNA von den genannten Parametern abhängig ist. Insbesondere die Art und Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs beeinflussen das Ergebnis der Kondensationsmessung.

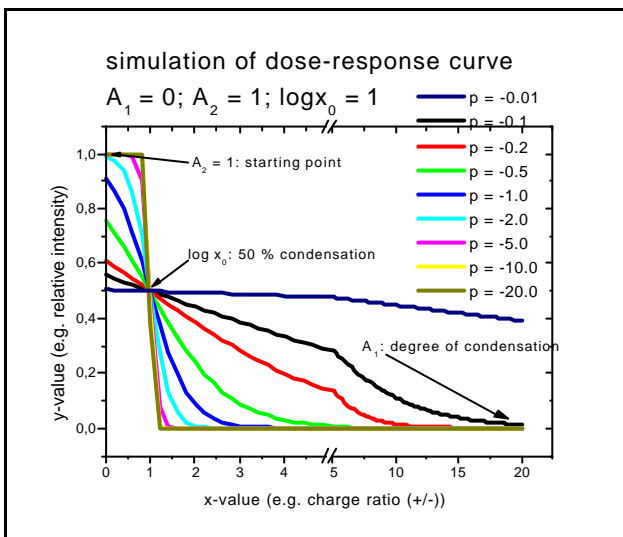


Abbildung 7-35: Dosis-Wirkungs-Kurve (Hill-Plot). Der Startwert, dem sich die einzelnen Kurven jeweils asymptotisch nähern ist 1. Der Endwert, dem sich die einzelnen Kurven asymptotisch nähern ist 0. Alle Kurven schneiden sich in dem Punkt $x = 1 / y = 0,5$, da der $\log x_0$ auf den Wert 1 fixiert wurde. Dargestellt ist die Änderung des Kurvenverlaufs (insbesondere der Steigung) bei variablem Hill-Koeffizienten. Nähert sich der Hill-Koeffizient asymptotisch dem Wert 0, so nimmt die Hill-Kurve die Form einer Gerade an. Mit steigendem Betrag des Hill-Koeffizienten nimmt die Steigung / Neigung im Bereich des schnellen Abfalls zu.

Eine Anpassung an mathematische Modelle zur Beschreibung der Titrationskurven erfolgt mit Hilfe der **Hill-Funktion**, die im folgenden beschrieben wird:

Die Titrationskurven kondensierter Nukleinsäuren lassen sich an lineare oder sigmoidale Kurven anpassen. Die Hill-Funktion (Formel 7-1) beschreibt eine mathematische Funktion, mit der sich sowohl sigmoidal als auch linear verlaufende Funktionen anpassen lassen. Die Steilheit der Kurve wird durch den Hill-Koeffizienten (slope p) charakterisiert. Zur Einordnung des Kurvenverlaufs von Kondensationskurven mit unterschiedlichen Hill-Koeffizienten ist in Abbildung 7-35 der Kurvenverlauf für verschiedene Hill-Koeffizienten dargestellt. Definitionsgemäß ist der erste Meßpunkt bei einer relativen Intensität von 1. Bei vollständiger Kondensation nimmt der asymptotische Endwert des Hill-Plots den Wert 0 an. Der $\log x_0$ -Wert beschreibt den x-Wert –also das Ladungsverhältnis (charge ratio +/-), bei welchem die Intensität 50 % des Intensitätsunterschiedes zwischen dem Startwert A_2 und dem Endwert A_1 erreicht hat.

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\log x_0 - x)^* p}}$$

A_1 = untere Asymptote für $p < 0$

A_2 = obere Asymptote für $p < 0$

$\log x_0$ = Zentrum

p = Hill Steigung

Formel 7-1: Hill-Gleichung

Die Charakterisierung der Titrationskurven erfolgt mit folgenden Parametern:

1. initiale Intensitätserhöhung

Die **initiale Intensitätserhöhung** wird durch den Parameter A_1 der Hill-Funktion gekennzeichnet. Ist der Parameter $A_1 > 1$, so nimmt bei negativen Komplexen die Fluoreszenzintensität zu. Erklärt werden kann dieses paradoxe Verhalten (erwartet wird eine leichte Abnahme oder Konstanz der Intensität) damit, dass die DNA in der Struktur durch die kationische Verbindung so verändert wird, dass die Affinität des Farbstoffs zur DNA erhöht wird. Zum einen können frei in Lösung befindliche Farbstoffmoleküle interkalieren, oder die Fluoreszenzausbeute der interkalierenden Farbstoffe wird durch die Änderung der DNA-Struktur erhöht.

2. maximales Ausmaß der Kondensation

Das **maximale Ausmaß der Kondensation** läßt sich durch den Parameter A_2 der Hill-Funktion beschreiben. Sie gibt das Ausmaß der Kondensation bei Zugabe der kationischen Verbindung im unendlichen Überschuß an.

3. Ladungsverhältnis für 50 %ige Kondensation

Das **Ladungsverhältnis für 50%ige Kondensation** (EC_{50}) ist das Ladungsverhältnis (+/-), bei welchem die DNA zu 50 % kondensiert ist. 50 %ige Kondensation ist durch

on ist durch $\frac{A_1 - A_2}{2}$ gegeben.

4. Kooperativität

Der Hill-Parameter p ist ein Maß für die Steigung der Hill-Funktion. Je größer der Betrag der Steigung p , desto steiler verläuft die Titrationskurve in dem Konzentrationsbereich, in dem bei geringen Änderungen der Konzentration eines Wirkstoffs / einer kondensierenden Verbindung sich der gemessene Effekt dramatisch verändert. Im Falle von Arzneistoffen, die an Rezeptoren von Zellen binden, bedeutet dieses die Änderung der Konformation eines Rezeptors, die die Affinität für weitere Wirkstoffmoleküle zu dem Rezeptor erhöht, so dass der Effekt bei der Zugabe

des folgenden Wirkstoffquantums nichtlinear verstärkt wird. Im Falle der Kondensation von Nukleinsäuren zeigt ein großer Betrag des Kooperativitätsfaktors p ebenfalls an, dass die Anlagerung weiterer kondensierender Moleküle an die DNA erleichtert wird. Im Falle von polykationischen Verbindungen, insbesondere dem Protamin kann auch durch intramolekulare Wechselwirkung die Anlagerung weiterer kationischer funktioneller Gruppen mit der Folge einer weiteren Kondensation an die Nukleinsäure erfolgen. Monokationische Verbindungen können nur durch die Anlagerung weitere Moleküle an die Nukleinsäure zu einer weiteren Konformationsänderung, die die Affinität kationischer Reagentien zur Nukleinsäure erhöht, anlagern.

5. kinetische Effekte

Durch zeitabhängige Darstellung der oben aufgeführten Parameter kann das kinetische Verhalten der DNA-Kondensation als Funktion des Fluoreszenzfarbstoffs charakterisiert werden.

Ethidiumbromid und **TOTO-3** sind Farbstoffe, bei denen das Fluoreszenzsignal zwischen individuellen Messungen stark streut, so dass die beiden Farbstoffe aufgrund der Streuung für die quantitative Messung der Kondensation wenig geeignet sind.

Ethidiumhomodimer-2 ist geeignet für die Messung von Kompleyreifungsvorgängen.

TOTO-1 ist durch Protamin nicht aus dem Komplex zu verdrängen. Ein Anstieg der Fluoreszenz zeigt, dass die Struktur der Plasmid-DNA derart verändert wird, dass die Affinität des Farbstoffs zur DNA erhöht wird. Eine Komplexierung mit DOTAP-Liposomen führt zu einer zeitabhängigen Fluoreszenzabnahme. Unter Bedingungen, bei denen im PicoGreen™-Assay keine Veränderung der Kondensation messbar ist, kann mit TOTO-1 eine Veränderung der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass TOTO-1 gar nicht aus dem Komplex mit der DNA durch Kondensation verdrängt wird, sondern dass eine Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffs in noch vorhandene intakte Liposomen oder in Lipidbilayer erfolgt. Folge ist dann die Abnahme der Fluoreszenz, weil weniger Farbstoff für die Bindung an die Nukleinsäure zur Verfügung steht. Positiv unterstützt wird dieses dadurch, dass die Fluoreszenzintensität unter Verwendung von Protaminsulfat konstant bleibt. Die hohe Fluoreszenzintensität unter kondensierenden Bedingungen macht TOTO-1 zu einem idealen Werkzeug für das intrazelluläre Monitoring der Verteilung von applizierten Nukleinsäuren in der Zelle, falls keine Austauschprozesse mit zelleigenen Nukleinsäuren stattfinden. Da die Fluoreszenz nicht gequencht wird, kann durch fluoreszenz- oder konfokale Mikroskopie die intrazelluläre Prozessierung verfolgt werden. Untersucht werden muß aber noch, ob es zu Austauschvorgängen mit intrazellulären Nukleinsäuren kommen kann. Wegen der Nichtverdrängbarkeit aus dem Komplex durch kondensierende Reagentien ist es möglich, dass der TOTO-1-DNA-

Komplex so stabil ist, dass keine Austausch des Fluoreszenzmarkers mit intrazellulären Nukleinsäuren erfolgt.

Ethidiumhomodimer-2, YOYO-1, YO-PRO-1 und PicoGreen™ sind aufgrund

- der hohen Fluoreszenzausbeute,
- der Stabilität des Farbstoff-DNA-Addukts und
- der Fähigkeit des Quenching der Fluoreszenzintensität bei Zugabe kationischer Verbindungen
- sowie der Eigenschaft, Komplexreifungsvorgänge durch Änderung der Fluoreszenzintensität analytisch zugänglich zu machen,

ideale Farbstoffe für die Messung der DNA-Kondensation.

PicoGreen™ hat sich von einer Vielzahl verschiedener interkalierender DNA-Farbstoffe als vorteilhaft erwiesen. Die Vorteile von PicoGreen™ sind

1. ***keine Hintergrundfluoreszenz der Lösung des Farbstoffs in Pufferlösungen***

Viele Fluoreszenzfarbstoffe zeigen auch in freier Form in Lösung eine Eigenfluoreszenz. Bei der fluorimetrischen Messung der DNA-Kondensation entsteht ein Vielstoffsystem aus Plasmid-DNA, kondensierenden kationischen Verbindungen und dem Fluoreszenzfarbstoff. Es können somit Wechselwirkungen zwischen den genannten Komplexen auftreten. Die amphiphilen Fluoreszenzfarbstoffe können sich in die lipophile Phase der Liposomen einlagern, die Komplexe aus DNA und Farbstoff können sich in kationische Lipidstrukturen einlagern, die DNA wird durch die kationischen Substanzen kondensiert, so dass sich die Affinität zu den Fluoreszenzfarbstoffen ändert. Durch die Wahl eines Fluoreszenzfarbstoffes, der in der ungebundenen Form keine Eigenfluoreszenz aufweist, sind weniger Wechselwirkungen möglich (s. Abbildung 12-1).

2. ***Linearer Bereich über einen Konzentrationsbereich von drei Zehnerpotenzen***

Das Standardprotokoll für PicoGreen™ schreibt eine Farbstoffkonzentration von 5 µl / 2 ml DNA-haltiger Lösung vor. Für diese Konzentration wird vom Hersteller ein linearer Bereich von 25 pg / ml bis 1 µg / ml DNA angegeben. DNA-Kondensation kann somit innerhalb des linearen Bereichs mit einer einzigen Farbstoffkonzentration gemessen werden [137].

3. ***Ein Variieren der Farbstoffmenge von 0,27 µg/ml zu 1,33 µg/ml führt nicht zu einer messbaren Veränderung der DNA-Kondensation.***

Durch die Unabhängigkeit der DNA-Kondensation von der zugesetzten Farbstoffmenge kann mit einer fixen Farbstoffkonzentration gearbeitet werden. Weiterhin zeigt die Unabhängigkeit der Kondensation von der zugesetzten Farbstoffmenge, dass PicoGreen™ selber keine

ausgeprägten kondensierenden Eigenschaften aufweist. Für EB ist beschrieben, dass überdrillte (supercoiled) DNA in den relaxierten und bei weiterer Erhöhung der Farbstoffkonzentration eine in eine revers-supercoiled Konformation dekondensiert und wieder kondensiert werden kann. Zum einen kann somit durch den zugesetzten interkalierenden Farbstoff die native Struktur der Plasmid-DNA geändert werden, die zu einem veränderten Kondensationsverhalten führt, die nicht mehr den realen Bedingungen im Zellkultur- oder Tierversuch entsprechen. Daher führt die Verwendung eines hochsensitiven Farbstoffs wie PicoGreen™, der in wesentlich geringeren Konzentrationen eingesetzt werden kann wie die Standardverbindung EB zu weniger artifiziellen Veränderungen der DNA-Struktur.

4. Nachteilig ist, dass die chemische Beschaffenheit und Konzentration des interkalierenden Farbstoffs und somit ebenso toxikologische Eigenschaften für PicoGreen™ nicht beschrieben sind.

Die Kondensation von Plasmid-DNA ist vom verwendeten Puffer, der Inkubationszeit des Komplexes und der zugesetzten Protaminmenge abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass die Kinetik der Kondensation mit Protaminsulfat

- in 2 verschiedenen Phasen abläuft, nämlich
 - a. *Primärkondensation* = schnelle Kondensation innerhalb von 15 Minuten
 - b. *Sekundärkondensation* = Komplexreifung mit geringen Änderungen der Intensität und
- drei verschiedene Typen von Komplexen unterschieden werden können, nämlich
 - a. Typ A: Komplexe mit einem Ladungsverhältnis größer 3,5:1 (+/-)
 - b. Typ B: Komplexe mit einem Ladungsverhältnis von größer 1:1 (+/-) bis 3,5:1 (+/-)
 - c. Typ C: negativ geladene oder neutrale Komplexe

In Tris-Puffer erfolgt eine stärkere Kondensation der DNA als in Phosphat-Puffer während der Primärkondensation. Aufgrund der vollständigen Kondensation ist keine Komplexreifung in der Sekundärphase nachweisbar. Die Primärkondensation ist in Phosphatpuffer weniger vollständig, eine Abnahme der Fluoreszenz auf die Basislinie ist in der Sekundärphase messbar.

Tris/Tris-HCl ist ein monokationisches Puffersystem, während Phosphat bei pH 7,5 ein Puffersystem aus mono- und dianionischen Molekülen ist. Tris kann als monokationische Verbindung mit den Natriumionen als Gegenion zur DNA in Wechselwirkung treten und diese aus der Salzbindung verdrängen. Das Gegenion des Phosphatpuffers ist Natrium und hat daher keinen Einfluß auf den Zustand der DNA in der Lösung. Andererseits ist auch eine Wechselwirkung mit dem kondensierten

sierenden Agens möglich. Hydrogenphosphatanionen können als Gegenion Sulfat aus der Bindung mit dem Protamin verdrängen und dadurch die Konformation von Protamin beeinflussen.

Eine genauere Untersuchung der Ursachen für das veränderte Kondensationsverhalten ist möglich, wenn systematisch die Puffer so verändert werden, dass Puffersalze mit gleichen Puffer-substraten aber unterschiedlichen Gegenionen verwendet werden.

Die Bedeutung der Sekundärphase der Komplexreifung ist für die Anwendung von Nukleinsäuren nicht geklärt. In Zellkulturversuchen werden die Komplexe meistens für einen Zeitraum von 15 min bis 60 min inkubiert und dann werden die Komplexe auf die Zellen übertragen. In TPuffer könnten die Komplexe so stabil sein, dass die Freisetzung der DNA nur unzureichend erfolgen kann. Andererseits ist es möglich, dass die Stabilität der Komplexe in Tris-Puffer so groß ist, dass die DNA vor enzymatischem Abbau im Lysosom geschützt wird und somit effektiv in den Zellkern transportiert werden kann.

Beim Inkubieren in Phosphat-Puffer ist nach der primären Kondensation bei Typ B und C eine weitere Abnahme der Fluoreszenzintensität messbar. Die Vorgänge auf molekularer oder kolloidaler Ebene in der Reifungsphase sind bisher nicht bekannt. Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Vorgänge in der Sekundärphase ist wesentlich geringer als die schnelle Kondensation in der Primärphase. Bei der Bildung des Primärkomplexes aus DNA und Protamin erfolgt ein schnelles Kollabieren der DNA. In der Sekundärphase treten Neuordnungen auf molekularer Ebene in den DNA-Protaminkomplexen auf, die zu einer Verminderung der Fluoreszenzausbeute führen. Durch die Neuorganisation der DNA kann sich die Affinität von DNA-abbauenden Enzymen zu der komplexierten Nukleinsäure ändern, so dass es zu einem verstärkten oder verminderten enzymatischen Abbau in der Zelle kommen kann.

Kondensation	Tris-Puffer	Phosphat-Puffer
Typ A	<ul style="list-style-type: none"> - Schnelle und vollständige Kondensation schützt evtl. vor enzymatischem Abbau - Zu starke Kondensation, so dass evtl. keine Freisetzung aus dem Komplex 	<ul style="list-style-type: none"> - Unvollständige Kondensation ermöglicht evtl. enzymatischen Abbau - Freisetzung aus dem Komplex möglich
Typ B	<ul style="list-style-type: none"> - Unvollständige Kondensation - Enzymatischer Abbau evtl. möglich - Komplexreifung als Optimierungsfaktor für Transfektionssysteme 	
Typ C	<ul style="list-style-type: none"> - Keine Kondensation 	

Tabelle 7-1: Kinetik der Kondensation von Plasmid-DNA mit Protaminsulfat und mögliche Folgen für Transfektion von Zellen

Zusammenfassung

Die Kondensation von Nukleinsäuren ist durch fluorimetrische Messung der Nukleinsäurekondensation untersucht worden. Mit Fluoreszenzfarbstoffen, die sich in die Helix der DNA einlagern, kann diese fluoreszenzmarkiert werden. Durch Zugabe von kationischen kondensierenden Verbindungen wird die Struktur der Nukleinsäure derart verändert, dass der Fluoreszenzfarbstoff seine Affinität zur Nukleinsäure verliert und dadurch die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts verringert wird. Eine Reihe verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ist hinsichtlich der Wechselwirkung mit Protaminsulfat und DOTAP untersucht worden. Dabei zeigte sich, dass einige Fluoreszenzfarbstoffe nicht aus der Bindung mit der DNA durch die kondensierenden Verbindungen verdrängt werden konnten (TOTO-1). PicoGreen™ ist ein hochempfindlicher Farbstoff ohne Hintergrundfluoreszenz, der wegen der guten Reproduzierbarkeit und der Stabilität des Fluoreszenzsignals angewendet werden kann, so dass PicoGreen™ anstelle des bisher am häufigsten eingesetzten Ethidiumbromids zur Messung der DNA-Kondensation verwendet werden sollte.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die DNA-Kondensation ein kinetischer Prozess ist. Komplexreifungsvorgänge, die sich in einer zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenzintensität zeigen, können fluorimetrisch schnell, einfach und mit einem hohen Probendurchsatz gemessen werden.

8 Inkrementelle Nukleinsäurekondensation: Hochleistungsmethode zur zeitunabhängigen Kondensationsmessung

Einleitung

Wie in Kapitel 7 dargestellt, beeinflussen zahlreiche Faktoren die Kondensation von Nukleinsäuren mit kationischen Verbindungen, so dass eine systematische Untersuchung der beeinflussenden Faktoren nur durch Meßmethoden möglich ist, die einen hohen Probendurchsatz ermöglichen. Daher ist eine Hochleistungsmeßmethode mit einem hohem Probendurchsatz entwickelt worden, mit der 72 Kondensationsmessungen innerhalb kurzer Zeit aufgezeichnet und in Form von Titrationskurven ausgegeben und ausgewertet werden können.

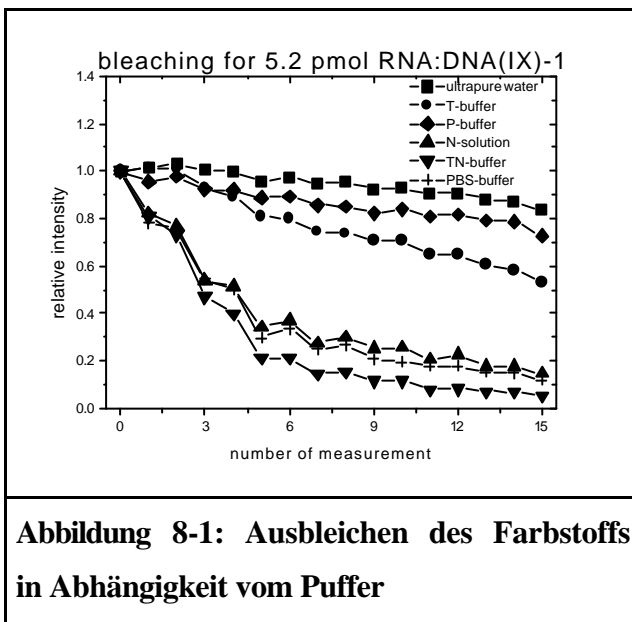
- Die Robustheit des Systems wird untersucht, indem analytische Parameter mit Einfluß auf die Auswertung der Messungen zur Kondensation von Nukleinsäuren dargestellt werden (Photobleaching, Fluoreszenzfarbstoffe),
- desweiteren werden exemplarisch mögliche Variablen mit Einfluß auf die Nukleinsäurekondensation vorgestellt und schließlich
- Ergebnisse zur systematischen Untersuchung der Nukleinsäurekondensation von verschiedenen Arten von Nukleinsäuren und kationischen Kondensationsreagentien zusammengefaßt werden.

Im Gegensatz zum Kinetikassay (s. 7) erfolgt bei der hier verwendeten Methode der Zusatz der kationischen Verbindung zur Kondensation in inkrementellen Schritten, d.h. es wird nicht die gesamte Menge der kationischen Verbindung als Bolus zur DNA hinzugesetzt, sondern es erfolgt die Zugabe in kleinen Schritten. In der Regel wird mit jeder Zugabe das Ladungsverhältnis um 0,2 geändert, so dass nach 5 Pipettierungen Ladungsneutralität erreicht wird.

Ergebnisse

8.1 Ausbleichen von fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuren

Zur **Optimierung des Puffersystems** für die Nukleinsäure-Kondensation ist das Ausblei-



chen von OliGreen™ in Abhängigkeit vom Puffersystem untersucht worden. Neben Reinstwasser ist hypotonischer Tris-Puffer (10 mM pH 7,5) und Phosphat-Puffer (7,5 mM, pH 7,5) im Vergleich mit isotonischen Lösungen (N-Lösung, TN-Puffer, PBS-Puffer, jeweils pH 7,5) untersucht worden (Abbildung 8-1). Das Photobleaching ist von der Ionenstärke des verwendeten Puffers abhängig. Reinstwasser und hypotone Pufferlösungen zeigen ein geringes Ausbleichen des Farbstoffs mit Hybridoligonukleotiden. Nach Ende der Versuchsdurchführung (8 Stunden) wa-

ren noch über 50 % der Ausgangsintensität meßbar. Isotonische Pufferlösungen zeigen bereits nach einer Zeit, die der 6. Zugabe des kondensierenden Reagenzes entspricht, eine Verringerung der NA-Fluoreszenzintensität auf 20-30 % der Ausgangsintensität.

8.2 Farbstoffe

Der Fluoreszenzanstieg von PicoGreen™, OliGreen™ und RiboGreen™ fluoreszenzmar-

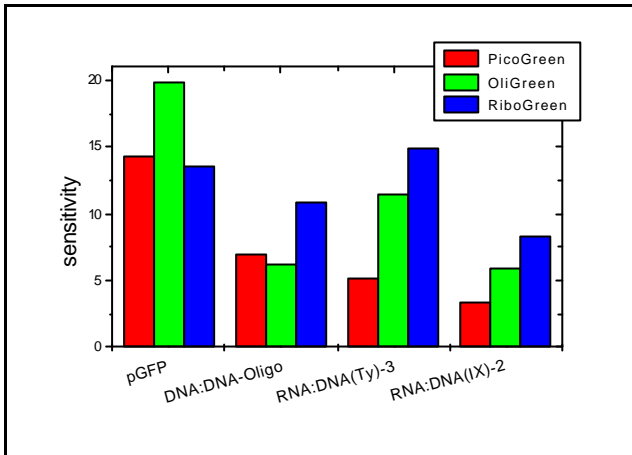


Abbildung 8-2: Farbstoffe zur Messung der inkrementellen Kondensation². 474 pmol NA (bezogen auf negative Ladungen) in einem Nöpfchen sind mit 0,25 µl des jeweiligen Farbstoffs versetzt worden. Die Empfindlichkeit (sensitivity) ist folgendermaßen de-

finiert:
$$sensitivity = \frac{INT_{DNA+Farbs}}{INT_{Puffer}}$$

kierten Nukleinsäuren (Plasmid, DNA:DNA-ON, RNA:DNA-ON) ist untersucht worden (Abbildung 8-2). Der Fluoreszenzanstieg gegenüber dem Hintergrundsignal in einer weißen 96-well-Platte zeigt, dass die Fluoreszenzausbeute von *Plasmid-DNA* (GFP) mit OliGreen™ am höchsten ist. PicoGreen™ und RiboGreen™ zeigen ungefähr die gleiche Fluoreszenzerhöhung um einen Faktor 13-14 in bezug auf die Hintergrundfluoreszenz. Das *DNA:DNA-ON* bindet neben OliGreen™ ebenfalls hochsensitiv PicoGreen™ und RiboGreen™. Das *Hybridoligonukleotid* zeigt die höchste Affinität zu RiboGreen™. Die Intensität wird gegenüber dem Hintergrundsignal für das RNA:DNA-ON(Ty) um einen Faktor von 15 verstärkt. OliGreen™ verstärkt die Intensität um einen Faktor von 12,

während PicoGreen™ zum Hybridoligonukleotid die geringste Affinität hat.

² Die Fluoreszenzsensitivität für das DNA:DNA-oligo mit OliGreen™ wurde durch Extrapolieren einer Messung mit 610 pmol Oligonukleotide (berechnet als negative Ladungen) auf 474 pmol Oligonukleotid (berechnet als negative Ladungen) extrapoliert.

8.3 Variablen der Nukleinsäurekondensation

Einfluß der Plasmid-Menge auf die DNA-Kondensation

In Abbildung 8-3 ist die Kondensation variabler Mengen GFP-Plasmid mit Protaminsulfat

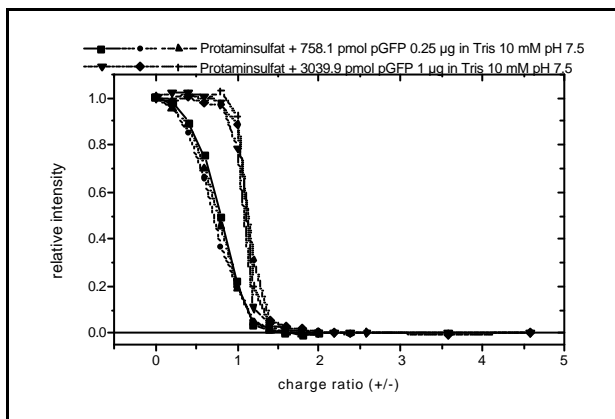


Abbildung 8-3: Kondensation von variierenden Massen von Plasmid-DNA mit Protaminsulfat

	0.25 µg	1.00 µg
Initial(A1)	-0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00
Final (A2)	1.01 ± 0.02	1.00 ± 0.01
EC50 (LOGx0)	0.75 ± 0.04	1.11 ± 0.04
Slope (p)	-2.48 ± 0.16	-7.25 ± 1.06

Tabelle 8-1: Parameter der Hill-Funktion zur Charakterisierung der Plasmid-Kondensation mit variablen Mengen GFP-Plasmid. Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen (s. Abbildung 8-3) sind dargestellt.

DNA wird mit AVE™-3 gemischt und zu dem Gemisch der beiden negativen Formulierungen wird die kationische Verbindung inkrementell zupipettiert. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Messungen, die als Dreifachbestimmungen durchgeführt worden sind, in Bezug auf die Parameter, die die Hill-Funktion charakterisieren feststellbar. Der EC₅₀-Wert steigt von

dargestellt. Das kooperative Bindungsverhalten wird durch Anpassung der Messwerte an die Hill-Funktion charakterisiert. Der Hill-Faktor ist von der Konzentration der verwendeten Nukleinsäure abhängig. Initiale und finale Fluoreszenzintensität zeigen keine Abhängigkeit von der verwendeten DNA-Menge. Der EC₅₀-Wert ist ebenfalls von der verwendeten Menge der kationischen Verbindung abhängig. Während bei 0,25 µg Plasmid-DNA bereits bei einem Ladungsverhältnis von 0,75 (+/-) 50 %ige Kondensation erreicht wird, ist mit 1 µg DNA ein 1,11 (+/-)-Ladungsverhältnis notwendig, um 50 %ige Kondensation der Nukleinsäure zu erreichen. Der Hill-Faktor (s. Formel 7-1, S. 126) ändert sich von -2,48 für 0,25 µg auf -7,25 für 1,00 µg Plasmid-DNA (Tabelle 8-1).

Einfluß von AVE™-3 auf die DNA-Kondensation

In der linken Spalte der Tabelle 8-2 ist die Kondensation von Plasmid-DNA mit Protaminsulfat mit bzw. ohne AVE™-3 dargestellt. Plasmid-

1,11 auf 1,24, der Hill-Koeffizient ändert sich von $-7,25$ zu $-5,40$ durch die Zugabe der negativ geladenen Liposomenformulierung (Tabelle 8-2 links). Der dekondensierende Effekt von AVETM-3 ist bei der Kondensation mit PEI stärker ausgeprägt (s. Abbildung 8-4 rechts). Es ist ein größerer Überschuß kationischer Ladung notwendig, um das gleiche Ausmaß der Kondensation zu erreichen im Vergleich zu Kondensationsexperimenten, die ohne Zusatz von AVETM-3 durchgeführt werden. Dementsprechend ist der EC₅₀-Wert bei AVETM-3-haltiger Formulierung erhöht und der p-Wert ändert sich von $-1,28$ nach $-0,81$ durch die Zugabe der negativ geladenen Liposomen zur DNA-Lösung.

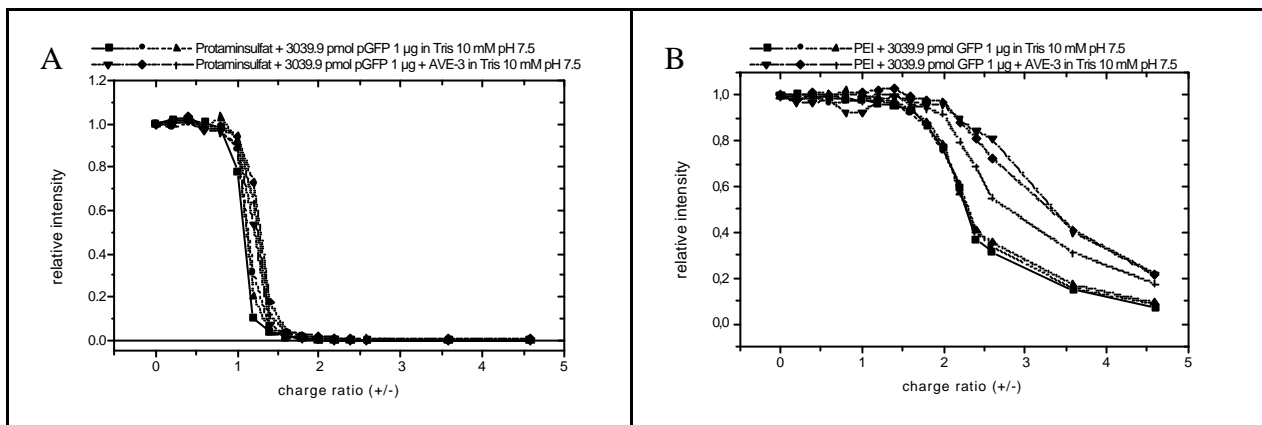


Abbildung 8-4: Kondensation von Plasmid-DNA mit Protaminsulfat (links) und PEI (rechts): Einfluß negativ geladener AVETM-3-Liposomen auf die Stabilität der DNA-Kondensate

	PS ohne AVE	PS mit AVE	PEI ohne AVE	PEI mit AVE
Initial(A1)	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Final (A2)	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,01 ± 0,01	1,00 ± 0,00
EC50 (LOGx0)	1,11 ± 0,04	1,24 ± 0,03	2,72 ± 0,36	3,20 ± 0,30
Slope (p)	-7,25 ± 1,06	-5,40 ± 0,10	-0,81 ± 0,15	-1,28 ± 0,18

Tabelle 8-2: Parameter der Hill-Funktion zur Kondensation von Plasmid-DNA mit PS und PEI mit und ohne AVETM-3

8.4 Puffer

In Abbildung 8-5 a ist die Kondensation des *kovalent fluoreszenzmarkierten DNA:DNA-Oligonukleotid* in **Reinstwasser** dargestellt. Die Fluoreszenzintensität nimmt in Reinstwasser mit den verwendeten kationischen Transfektionsagentien zu bzw. bleibt konstant. Die Zunahme der relativen Fluoreszenz erfolgt teilweise bis zu einem Faktor von > 10 .

Wird die Kondensation mit OliGreen™-markiertem *RNA:DNA-Hybridoligonukleotid* in Reinstwasser gemessen (Abbildung 8-6 a), so ist für alle Trägersysteme eine ladungsabhängige Abnahme der Fluoreszenzintensität nachweisbar.

Erfolgt die Kondensation des *kovalent markierten ON* in einer blutisotonen Natriumchloridlösung (**N-Lösung**), so ist bei Kondensation mit PEI eine lineare Abnahme der Fluoreszenz nachweisbar, wobei bei einem Ladungsverhältnis von 3:1 (+/-) die Basislinie noch nicht erreicht ist. Mit Protaminsulfat wird die Basislinie ab einem Ladungsverhältnis von 1,5:1 (+/-) erreicht. DOTAP kondensiert bis zu einer RI von 0,2. Dieser Grenzwert wird auch bei einem Ladungsverhältnis von ca. 1,5:1 (+/-) erreicht. DOTAP/DOPE führt zu einem leichten Fluoreszenzanstieg. Es ist für dieses System keine Kondensation nachweisbar (Abbildung 8-5 b). Wird mit OliGreen™-markierten *RNA:DNA-Hybridoligonukleotiden* in N-Lösung die Komplexbildung gemessen, so zeigt PEI eine schwache Kondensation bis zu einer RI von ca. 0,6, wobei die Einzelwerte stark streuen. PS kondensiert die DNA vollständig. Beim Ladungsverhältnis von 2,5:1 (+/-) wird die Basislinie erreicht. DOTAP und DOTAP / DOPE-Liposomen zeigen ein sehr heterogenes Kondensationsverhalten. Es erfolgt bei beiden Systemen ein Fluoreszenzanstieg bis zu einem Ladungsverhältnis von 1,5:1 (+/-) bis 2,0:1 (+/-), der von einer Fluoreszenzabnahme gefolgt wird, die das gleiche Ausmaß erreicht wie die Kondensation mit PEI (Abbildung 8-6 b).

Wird das kovalent markierte *DNA:DNA-ON* in hypotonem **T-Puffer** kondensiert, ist für PEI eine lineare Abnahme der Fluoreszenz meßbar, die bei einem Ladungsverhältnis von 3:1 (+/-) die Basislinie fast erreicht. Protaminsulfat kondensiert maximal bis zu einer RI von 0,4, die bei einem Ladungsverhältnis von 1,2:1 (+/-) erreicht wird. Die Titrationskurve von DOTAP verläuft bis zu einem Ladungsverhältnis von 1,2:1 (+/-) parallel zu den PEI-Kurven, um sich dann auf einen konstanten Wert zwischen 0,5 und 0,6 einzupendeln. DOTAP / DOPE kondensiert die DNA nicht. Die RI beträgt für alle untersuchten Ladungsverhältnisse ca. 1 (Abbildung 8-5 c). Die Fluoreszenzabnahme von OliGreen™-markiertem *RNA:DNA-ON* erfolgt in T-Puffer für PEI ebenfalls linear. Wird mit PS kondensiert, so ist bereits bei einem Ladungsverhältnis von 2,0:1 (+/-) die Basislinie erreicht, während bei Kondensation mit PEI ein Ladungsverhältnis von 3,5:1 (+/-) für die vollständige Kondensation eingesetzt werden muß. DOTAP ist in T-Puffer ebenfalls in der Lage, bei einem Ladungsverhältnis von > 3,5:1 (+/-) bis zur Basislinie zu kondensieren. Die Titrationskurve von DOTAP/DOPE zeigt einen linearen Verlauf, wobei bei einem Ladungsverhältnis von 4,5:1 (+/-) die RI noch 40 % beträgt (Abbildung 8-6 c).

Wird der T-Puffer mit Natriumchlorid isotonisiert (**TN-Puffer**), so nimmt das Ausmaß der Kondensation des *kovalent markierten ON* für alle untersuchten Systeme ab. Bei gleichem Ladungsverhältnis ist die Kondensation –gemessen als RI- in der isotonisierten Lösung geringer, mit

Ausnahme der DOTAP-Liposomen, bei denen die Intensität im letzten Meßpunkt von 0,6 auf 0,43 abfällt (Abbildung 8-5 d). Bei mit OliGreen™-markiertem *Hybridoligonukleotid* nimmt die Fluoreszenz von PEI kondensierten Konstrukten schwach zu. PS führt bei einem Ladungsverhältnis von 2,6:1 (+/-) zu einer vollständigen Kondensation. DOTAP und DOTAP/DOPE sind in isotonischer Lösung nicht mehr in der Lage, das Hybridoligonukleotid zu kondensieren. Die RI nimmt auf Werte von 1,9 (DOTAP) bzw 1,5 (DOTAP/DOPE) zu (Abbildung 8-6 d).

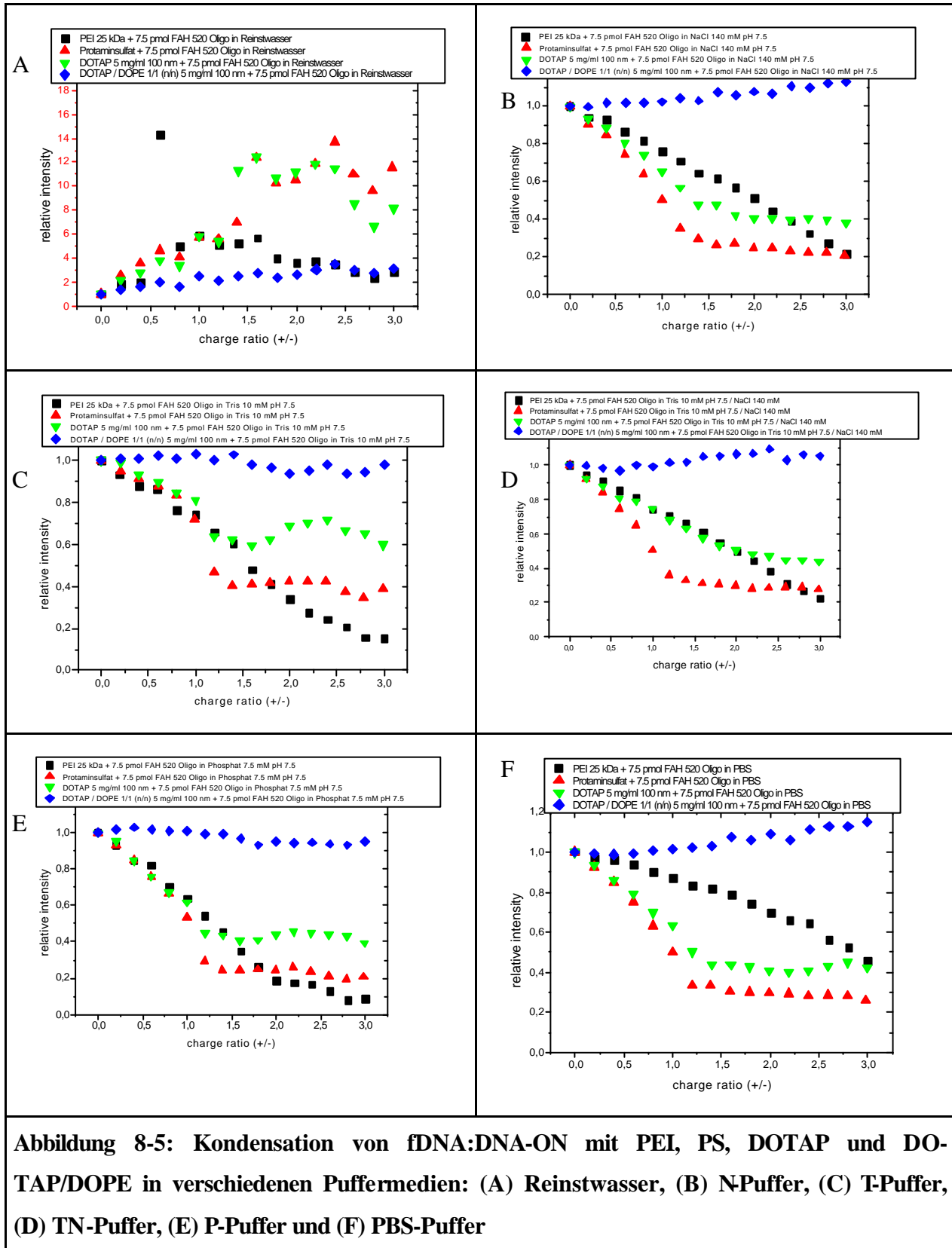
Wird das *fluoreszierende DNA:DNA-Oligo* in dem anionischen **Phosphat-Puffersystem** mit geringer Ionenstärke (7,5 mM Phosphat-Puffer) kondensiert, so erfolgt bei PEI eine lineare Fluoreszenzabnahme bis zur Basislinie bei einem Ladungsverhältnis von 3:1 (+/-). PS kondensiert die DNA bis zur RI von 20 %, die bei 1,2:1 (+/-) erreicht wird. Die Restintensität von DOTAP-komplexierter Nukleinsäure beträgt 40 %. DOTAP / DOPE kann in Phosphat-Puffer ebenfalls nicht kondensiert werden (Abbildung 8-5 e). *RNA:DNA-Hybridoligonukleotid* wird in P-Puffer von PEI und PS gleichermaßen linear bis zur Basislinie kondensiert, die bei den 3 Systemen bei einem Ladungsverhältnis zwischen 3,5 und 4,5:1 (+/-) erreicht wird. DOTAP kondensiert ebenfalls sehr gut bis zu einer Restintensität von 10 %, während der Versuch der Kondensation mit DOTAP/DOPE zu einem schwachen Anstieg der Fluoreszenzintensität führt (Abbildung 8-6 e).

In **PBS-Puffer**, einem isotonisierten Phosphat-Puffer, kann das *fluoreszenzmarkierte DNA:DNA-Oligo* PEI unter linearer Intensitätsabnahme bei einem Ladungsverhältnis von 3:1 (+/-) bis zu einer Restintensität von 40 % kondensiert werden. PS erreicht bei einem Ladungsverhältnis von 1,2:1 (+/-) den Minimalwert, der durch eine Restintensität von 25-30 % gekennzeichnet ist. DOTAP kondensiert in PBS ähnlich wie PS, die Restintensität beträgt allerdings 40 %, während DOTAP/DOPE in PBS-Puffer nicht zu einer meßbaren Kondensation der Nukleinsäure führt (Abbildung 8-5 f). Die Kondensation von OliGreen™-markiertem *Hybridoligonukleotid* läßt sich in PBS-Puffer nicht messen. Während PEI bei einem Ladungsverhältnis > 4:1 (+/-) zu Komplexen mit einer Restfluoreszenz von 60 – 80 % führen, kann PS in dem isotonischen Puffer bei einem Ladungsverhältnis von 3:1 (+/-) die Nukleinsäure vollständig kondensieren, so dass keine Restfluoreszenz mehr meßbar ist. DOTAP und DOTAP / DOPE zeigen nach einem intensiven Fluoreszenzanstieg der schwach positiv geladenen Komplexe eine Abnahme der Fluoreszenz auf eine RI von ca. 0,3 und stellen damit in PBS-Puffer das zweitbeste kondensierende System nach PS dar (Abbildung 8-6 f).

Die Parameter der Hill-Funktion sind in Abbildung 8-7 dargestellt, in der oberen Zeile $f_{\text{FAMDNA:DNA-ON}}$, in der unteren Zeile OliGreen™-markiertes RNA:DNA-ON. A_1 ist die finale relative Intensität nach vollständiger Kondensation der Nukleinsäure. Kovalent markiertes Oligonukleotid ist durch DOTAP/DOPE in allen untersuchten Puffern nicht kondensierbar (RI = 1). DO-

TAP ist bis zu einer relativen Intensität von 0,4 kondensierbar, in TPuffer erfolgt nur eine Kondensation bis zu einem RI-Wert von 0,6. PS kondensiert die NA bis zu einer Restintensität von 0,2 bis 0,4, wobei in T-Puffer die höchste Restfluoreszenz verbleibt. PEI kondensieren die DNA vollständig. Die $\log x_0$ -Werte geben das Ladungsverhältnis an, welches zugesetzt werden muß, damit 50 %ige Kondensation erreicht wird. Bei PEI hängt die Kondensation vom Puffersystem ab. In blutisotonen Lösungen müssen mit PEI kationische Ladungen für ein Ladungsverhältnis zwischen 2,5:1 (+/-) und 4:1 (+/-) für 50 %ige Kondensation zugesetzt werden. Bei PS und DOTAP ist $\log x_0$ unabhängig vom verwendeten Puffersystem und beträgt ca. 1:1 (+/-). DOTAP/DOPE ist wegen der nicht vorhandenen Kondensation nicht auswertbar. Der Hill-Koeffizient von PS ist im Vergleich zu PEI signifikant erhöht. DOTAP-Kondensation ist ebenfalls hochkooperativ. In T-Puffer ist die Kooperativität am höchsten. Isotonische Puffermedien führen zu verringerten Kooperativitätsfaktoren.

Wird OliGreen™-markiertes RNA:DNA-ON kondensiert, so erfolgt in Wasser vollständige Kondensation (RI = 0). PEI kondensiert in Reinstwasser, T-Puffer und P-Puffer vollständig, während in N-Lösung, TN-Puffer und PBS-Puffer eine Restintensität von 60 – 80 % verbleibt. PS kondensiert in allen Medien vollständig. DOTAP kondensiert in hypotonen Medien vollständig, während bei isotonischen Lösungen eine Restintensität von 60 – 80 % verbleibt. DOTAP/DOPE ist nicht kondensierbar, in T-Puffer schwach kondensierbar. Die $\log x_0$ -Werte zeigen ebenfalls eine Abhängigkeit von der Isotonie. Bei Kondensation in Reinstwasser wird die geringste Menge der kationischen Verbindung benötigt. Durch den Intensitätszuwachs der isotonischen Lösungen im mittleren Konzentrationsbereich der kationischen Verbindung ist eine Auswertung der EC_{50} -Werte für N-Lösung sowie TN- und PBS-Puffer nicht möglich. In T-Puffer und P-Puffer wird ein Ladungsverhältnis von 2,5:1 (+/-) bei Kondensation mit PEI benötigt, um eine 50 %ige Kondensation zu erreichen. PS-Kondensation benötigt von diesen Puffermedien ein Ladungsverhältnis von ca. 1,5 (+/-) für die 50 %ige Kondensation. DOTAP kondensiert in hypotonen Pufferlösungen bei einem Ladungsverhältnis <1 zu 50 %, während in isotonen Lösungen ein Ladungsverhältnis von 2,5:1 bis 3:1 (+/-) zugesetzt werden muß. Protamin-Kondensate weisen die am weitesten im negativen Bereich liegenden P-Werte in allen Puffersystemen auf. Die Kooperativität ist bei Bindung von Protaminsulfat an DNA am größten. Der positive Hill-Koeffizient von PEI in TN-Puffer zeigt den Anstieg der Fluoreszenz an. In Reinstwasser ist die Kooperativität von PEI und PS vergleichbar, während in T-Puffer der p-Wert der Messung mit PS dem Betrag nach einen größeren Wert aufweist.



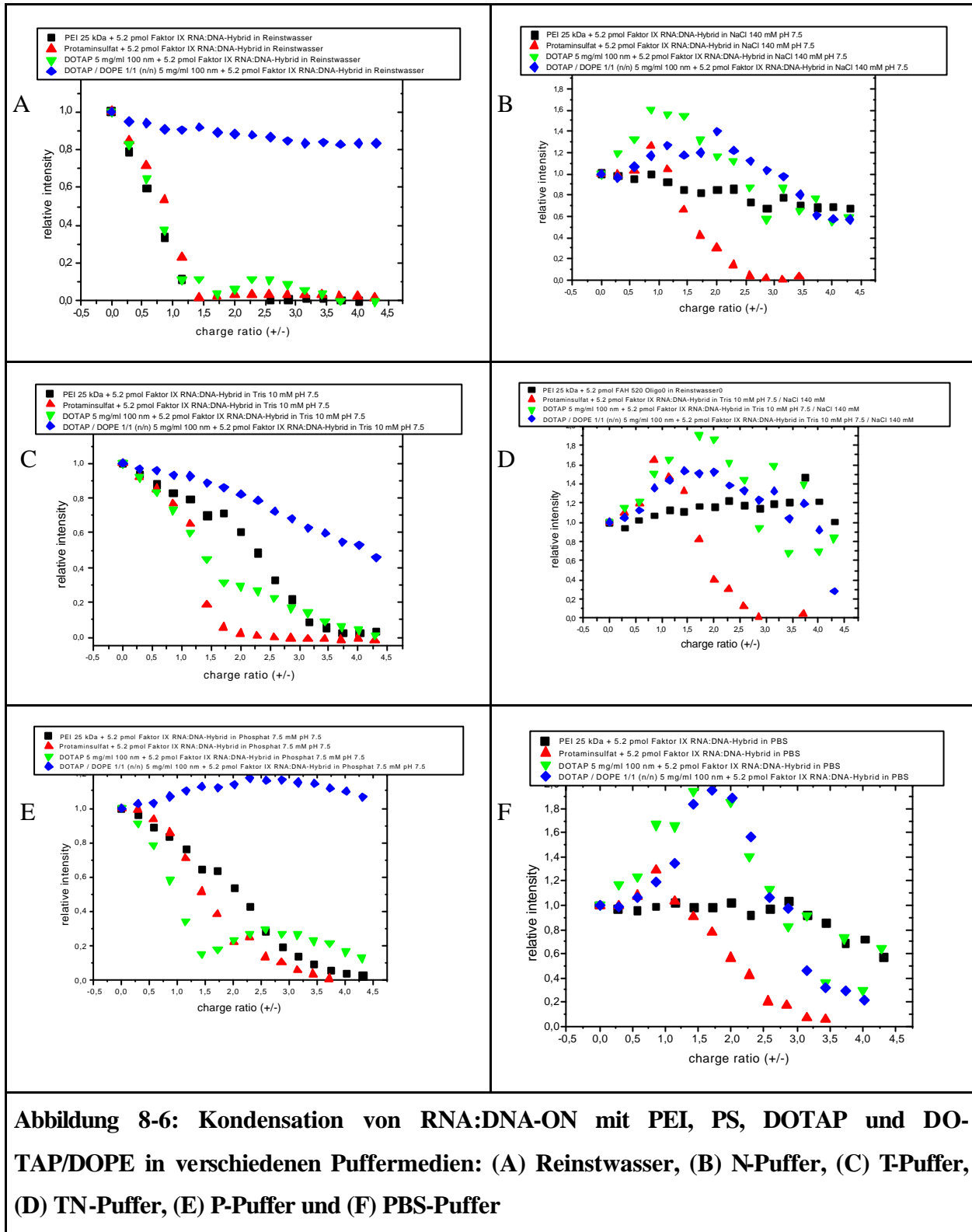


Abbildung 8-6: Kondensation von RNA:DNA-ON mit PEI, PS, DOTAP und DOTAP/DOPE in verschiedenen Puffermedien: (A) Reinstwasser, (B) N-Puffer, (C) T-Puffer, (D) TN-Puffer, (E) P-Puffer und (F) PBS-Puffer

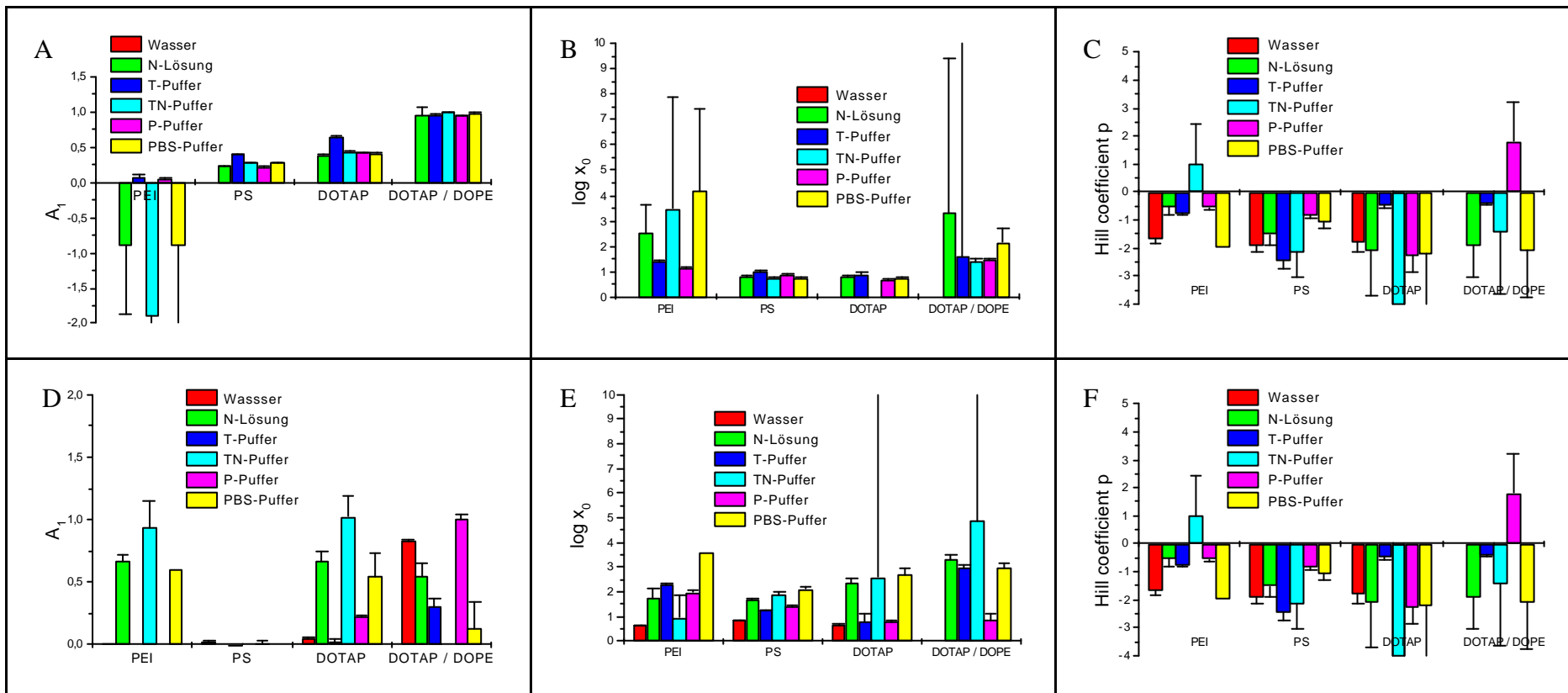
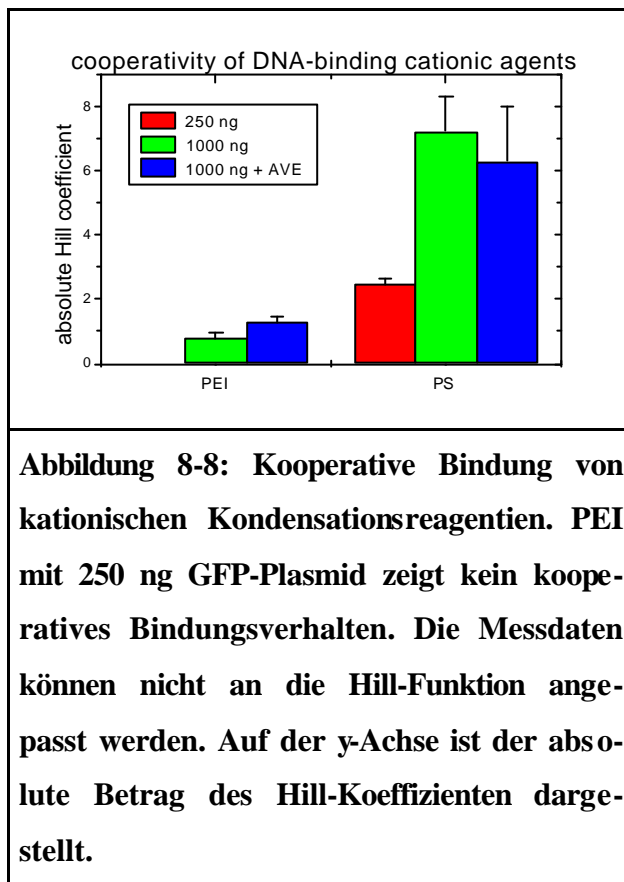


Abbildung 8-7: Hill-Parameter (Wert und Fehler) zur Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen kationischen Transfektionsreagentien und Oligonukleotiden in verschiedenen gepufferten und ungepufferten Lösungen. Obere Reihe: $f_{\text{FAM}}\text{DNA-DNA-ON}$; untere Reihe: OliGreenTM-markiertes RNA:DNA-ON. Zur Beschreibung der Parameter A_1 , $\log x_0$ und p siehe Formel 7-1, Seite 126.

8.5 Kooperativität: Vergleich der Kondensation von Plasmid-DNA mit Protaminsulfat und PEI

Ergebnisse

In der Abbildung 8-8 ist das kooperative Bindungsverhalten von PEI und Protaminsulfat mit Plasmid-DNA dargestellt. 250 ng Plasmid-DNA zeigen mit PEI kein kooperatives Bindungsverhalten. Es ist keine Anpassung an die Hill-Funktion möglich. Wird die DNA-Menge auf 1000 ng erhöht, so zeigt PEI sowohl in der Gegenwart als auch in Abwesenheit der negativ geladenen AVETM-3-Liposomen kooperatives Bindungsverhalten mit einem Hill-Koeffizienten von -0,81 bzw. -1,28. Protaminsulfat zeigt im Vergleich zu PEI ein deutlich stärker ausgeprägtes kooperatives Bindungsverhalten. Die Kooperativität ist eine Funktion der Nukleinsäuremenge. Der Kooperativitätskoeffizient nimmt bei Erhöhung der DNA-Menge von 250 ng auf 1000 ng für Protaminsulfat statistisch signifikant zu ($p = 0,00153$, ungepaarter zweiseitiger t-Test), während sich der Hill-Koeffizient bei der Kondensation in Abwesenheit und Gegenwart von AVETM-3 nicht signifikant unterscheidet ($p = 0,46011$). Die Hill-Koeffizienten für die Kondensation mit PEI und PS unterscheiden sich sowohl in Gegenwart von AVETM-3 ($p = 0,0067$) als auch in Abwesenheit der negativ geladenen Liposomen statistisch signifikant voneinander ($p = 4,79 \cdot 10^{-4}$).



8.6 Qualitätskontrolle durch Kondensationsmessung

Auf die DOTAP / DOPE-Charge, die f_{AM} DNA:DNA-ON und RNA:DNA-ON in Abhängigkeit vom Puffermedium nur sehr schlecht oder gar nicht kondensiert, ist bereits in 8.4 ausführlich hingewiesen worden.

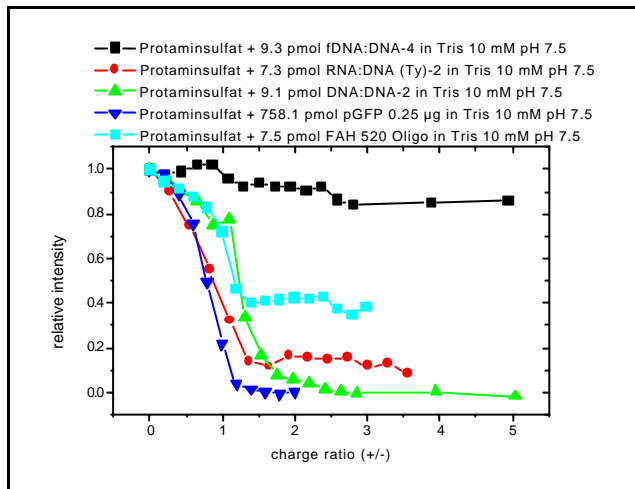


Abbildung 8-9: Qualitätskontrolle von Plasmid-DNA

Ein Vergleich verschiedener Nukleinsäurepräparationen zeigt, dass mit dem inkrementellen Kondensationsassay die Qualität verschiedener Nukleinsäurepräparationen beurteilt werden kann. Verschiedene Arten von Nukleinsäuren sind mit Protaminsulfat vollständig kondensiert worden (Abbildung 8-9). Alle Nukleinsäuren werden mit Protaminsulfat bei einem Überschuß kationischer Ladung kondensiert. Kovalent gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe erreichen einen Schwellenwert, im

Fall von f_{FAH} DNA:DNA-ON 40 % Restintensität. Eine Charge FITC-kovalent fluoreszenzmarkiertes DNA:DNA-Oligonukleotid (oberster Graph in Abbildung 8-9) ist durch Zugabe von Protamin nicht kondensierbar.

Diskussion

Das Ausbleichen von Hybridoligonukleotiden (s. 8.1) bei Zugabe von Wasser hängt von der Ionenstärke des verwendeten Puffers ab. Je geringer die Ionenstärke des verwendeten Systems, desto geringer ist das Ausbleichen des Fluoreszenzsignals. Die Abnahme des Fluoreszenzsignals bei hohen Ionenstärken kann mit einer Abnahme der Affinität des Fluoreszenzfarbstoffs zur Nukleinsäure begründet werden. Weiterhin ist es auch möglich, dass ein kinetischer kondensierender Effekt gemessen wird, der darauf beruht, dass die Ionen Lösungsmittelmoleküle beanspruchen, die dem Nukleinsäure-Farbstoff-Komplex entzogen werden, so dass es zu einer partiellen Kondensation der Nukleinsäure kommt, die zu einer Verringerung der Fluoreszenzausbeute führt. Eine Überprüfung ist mit dem Kinetikassay möglich, indem eine Kondensation der Nukleinsäuren mit steigenden Mengen von Natriumchlorid in z.B. Tris-Puffer durchgeführt wird.

Die Farbstoffe aus der „green-Familie“ sind hochsensitive Nukleinsäurefarbstoffe (s. 8.2). Die ungebundenen Farbstoffe zeigen keine Hintergrundfluoreszenz. Erst durch Einlagerung in die helikale Struktur der Nukleinsäuren wird die Emission so verstärkt, dass fluoreszierende Nukleinsäureaddukte entstehen, die bei Anregung bei 480 nm dann bei 520 nm grünes Licht emittieren. PicoGreen zeigt für hochmolekulare doppelsträngige Plasmid-DNA die höchste Empfindlichkeit und wird daher für die Kondensation von Plasmid-DNA als interkalierender Fluoreszenzfarbstoff verwendet. RiboGreen™ ist kein selektiver Farbstoff für eine bestimmte Nukleinsäureart [136], zeigt aber für Hybridoligonukleotide, die einzigen untersuchten Nukleinsäuren mit einem RNA-Anteil, die größte Sensitivität im Vergleich zu den anderen Farbstoffen mit Hybridoligonukleotiden. OliGreen™ bindet sowohl ssDNA als auch Oligonukleotide und wird daher als Farbstoff für DNA:DNA-Oligonukleotide und RNA:DNA-Oligonukleotide verwendet.

Die Menge der Plasmid-DNA beeinflusst nicht das maximale Ausmaß der Kondensation und das Ladungsverhältnis, bei dem die maximale Kondensation annähernd erreicht ist. Es wird aber die Steigung der Titrationskurve und der EC_{50} -Wert signifikant verändert, wenn die Plasmid- und Protaminmenge um den Faktor 4 erhöht wird (s. 8.3). Daraus können sich unterschiedlich strukturierte Komplexe ergeben, deren Transfektionseffizienz sich unterscheiden kann. Die veränderte Kooperativität kann in einem veränderten Mechanismus der Kondensation begründet sein. In hochkonzentrierten Nukleinsäurelösungen befinden sich mehr DNA-Moleküle in einem definierten Volumen. Wird die kationische Verbindung zugesetzt, so ziehen sich die gegensätzlich geladenen Makromoleküle gegenseitig an. In der hochkonzentrierten Lösung ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein DNA-Molekül mehrere Protaminmoleküle an sich bindet höher als in der niedriger konzentrierten Lösung, so überschüssige kationische Ladungsträger zur DNA-Kondensation verwendet werden können.

Die Stabilität der Komplexe in Gegenwart negativ geladener Liposomen ist Voraussetzung für die Kotransfektion von komplexierter DNA mit AVE™-3, die sich als negativ geladene Hülle um die kationischen DNA-Komplexe anlagern. Wird mit Protaminsulfat kondensiert, ist kein Unterschied bei Messung mit und ohne AVE™-3 messbar. Wird hingegen mit PEI kondensiert, so ist die Fluoreszenzintensität bei Anwesenheit negativ geladener Liposomen erhöht (s. 8.5). Da der Komplex von PS mit DNA in Anwesenheit von AVE™-3 stabiler ist, ist diese Formulierung für eine Kotransfektion besser geeignet. Wird mit PEI kondensiert, so muß im Vergleich zu Formulierungen ohne negativ geladene Liposomen die Menge des kationischen Agens erhöht werden, um die gleiche Kondensationseffizienz zu erreichen. Durch Anpassen an die Hill-Funktion kann der Kurvenverlauf mathematisch beschrieben werden und die Menge der kationischen Verbindung berechnet werden, um in Anwesenheit

der AVE™-3 auf den gleichen Grad der Kondensation einzustellen wie in Formulierungen ohne die umhüllenden Liposomen. Da der Komplex von PS mit DNA in Anwesenheit von AVE™-3 stabiler ist, ist diese Formulierung für eine Kotransfektion besser geeignet.

Die Diskussion der Daten zur Kondensationsmessung von

- 2 verschiedenen Nukleinsäuren mit unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung (kovalent vs. physikalisch),
- 6 verschiedenen Puffersystemen und
- 5 verschiedenen kationischen Verbindungen zur Kondensation von NA

erfolgt hinsichtlich der Puffersysteme und der kationischen Transfektionsreagentien.

Die Puffersysteme lassen sich einteilen in

- niedrigstosmolare Medien
 - Wasser
- hypoosmolare Medien
 - T-Puffer
 - P-Puffer
- Isotonische Medien
 - N-Lösung
 - TN-Puffer
 - PBS-Puffer

Die Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität von kovalent-fluoreszenzmarkiertem DNA:DNA-Oligo bei Kondensation in **Reinstwasser** ist über eine mögliche Bildung von großen Komplexen erklärbar. Dadurch kommt es zu einer Streuung des eingestrahnten Lichts und als Signal wird nicht das emittierte Fluoreszenzlicht, sondern lediglich das Streulicht erfasst. Desweiteren hat Reinstwasser keine Pufferkapazität. Geringe pH-Wertveränderungen, insbesondere im sauren Bereich können zu einer Protonierung des Fluoreszenzlabels führen, der dadurch seine Fähigkeit zur Fluoreszenz verliert. Durch die Zugabe kationischer Verbindungen, die durch die Anwesenheit von Aminfunktionen im neutralen pH-Bereich puffern, steigt der pH-Wert nach Zugabe der kationischen Verbindungen an mit der Folge, dass der saure Fluoreszenzlabel, der in wäßriger Lösung aufgrund des leicht sauren pH-Wertes des Reinstwassers in nichtfluoreszierender, protonierter Form vorliegt, dann deprotoniert wird. In der deprotonierten Form nimmt die Fluoreszenzausbeute zu und es wird eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität registriert. *Reinstwasser ist für das fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid kein geeignetes Medium für die Messung der Nukleinsäurekondensation.* Ob eine Strukturänderung zu einer kolloidalen, zellgängigen Struktur erfolgt, ist mit dieser Methode in Reinstwasser nicht überprüfbar. Zellkulturversuche müssen zeigen, ob die nichtnachweisbare Kondensation mit einer Nichttransfizierbarkeit von Zellen einhergeht.

OliGreen™-markierte Hybridoligonukleotide sind nur in hypoosmolaren Lösungen kondensierbar. In T-Puffer kondensieren PEI, PS und DOTAP das Hybridoligonukleotid vollständig. Auch die ansonsten schlecht kondensierende Probe DOTAP / DOPE zeigt in T-Puffer die besten Kondensationseigenschaften. Die schlechten Kondensationseigenschaften in isoosmolaren Lösungen können zum einen mit dem starken Ausbleichen der Komplexe erklärt werden. Andererseits ist die Restintensität ausreichend, um einen kondensierenden Effekt der kationischen Verbindungen messen zu können. PS erweist sich in allen isoosmolaren Lösungen als das Agens, welches die Nukleinsäure vollständig kondensieren kann.

Die Kooperativität der Bindung von **PEI** ist im Vergleich zu PS in allen Puffersystemen verringert. Die Kondensation erfolgt mit **PS** bei Überschreiten einer bestimmten Nukleinsäuremenge durch Kollabieren der DNA, während bei PEI mit jeder Ladungszugabe sich die Intensität linear ändert. Mit PEI kann somit auf einen bestimmten Kondensationsgrad eingestellt werden, während die Kondensation mit PS bei Überschreiten eines kritischen Ladungsverhältnisses zu einem Kollabieren in eine kompakte Struktur führt. Durch das inkrementelle Zugeben von PEI können sich evtl. geordnetere Strukturen ausbilden, weil die Kondensation stufenweise erfolgt und sich die Komplexe zwischen den einzelnen Kondensationsstufen zu stabilen Strukturen reorganisieren können.

DOTAP-Liposomen kondensieren etwas schwächer als PEI.

DOTAP/DOPE-Liposomen kondensieren beide Oligonukleotide sehr schlecht. Ursache ist hier nicht die Unfähigkeit von DOTAP/DOPE-Lipiden, Nukleinsäuren zu kondensieren, sondern eine chargenspezifische Nichtwirksamkeit dieser Charge. Mit anderen DOTAP/DOPE-Charge war Plasmid-DNA kondensierbar. Dass zwei verschiedene Nukleinsäurechargen, die auf unterschiedliche Art und Weisen fluoreszenzmarkiert worden sind, durch diese Liposomen nicht kondensierbar sind, weist darauf hin, dass hier ein chargenspezifisches Problem vorliegt.

Die Kooperativität der Bindung von kationischen Polymeren ist sowohl von der Art des kationischen kondensierenden Agens als auch von der Menge der eingesetzten Plasmid-DNA abhängig. Eine Erhöhung der Plasmid-Menge führt zu einer Erhöhung des Betrags des Hill-Koeffizienten. Wird mit Protaminsulfat kondensiert, ist der Betrag des Hill-Koeffizienten im Vergleich zu PEI erhöht. Das kooperative Verhalten von PS konnte sowohl für Plasmid-DNA als auch für Oligonukleotide demonstriert werden.

Durch die inkrementelle Nukleinsäurekondensation ist ein Nachweissystem für die schnelle analytische Beurteilung von verschiedenen Chargen von Nukleinsäuren und Chargen kationischer Transfektionsreagentien etabliert worden (s. 8.6).

Im Rahmen der routinemäßigen Qualitätskontrolle für verschiedene Chargen von Nukleinsäuren konnte gezeigt werden, dass

- eine DOTAP / DOPE-Charge in Abhängigkeit vom Puffermedium sowohl $f_{\text{FAMDNA:DNA-ON}}$ als auch RNA:DNA-ON ineffizient kondensiert,
- eine Charge eines FITC-fluoreszenzmarkierten DNA:DNA-Oligonukleotids nicht effizient durch PS kondensiert werden kann. Es gibt 2 verschiedene Carboxyfluorescein-Isomere mit Carboxylierung am 5-C und am 6-C. Durch die unterschiedliche Molekülgeometrie der beiden Derivate kann das Quenchen der Fluoreszenz des FITC-Isomers verhindert werden.

Weiterhin wird der Assay zur inkrementellen Kondensationsmessung als indirekte Methode zur Gehaltsbestimmung verwendet. Werden von verschiedenen Chargen gleicher Nukleinsäuren gleiche Mengen verwendet, so muß die Kondensation mit demselben Kondensationsagens zu den gleichen Parametern der Hill-Funktion führen, wenn die verschiedenen Chargen vergleichbare analytische Charakteristika aufweisen sollen.

Die inkrementelle Kondensationsmessung bietet die Möglichkeit in einem 96-well-assay, 6 verschiedene Zubereitungen kationischer Verbindungen mit 12 verschiedenen Nukleinsäuren und / oder Puffern zu vermessen. Der Assay ist somit eine geeignete Methode zum Screening für effiziente Gentransfersysteme sowie eine analytische Methode zur Qualitätskontrolle von Gentransfersystemen.

Zusammenfassung

Für die Messung der Kondensation von Oligonukleotiden und Hybridoligonukleotiden ist die Methode der "inkrementellen Messung der Nukleinsäurekondensation" entwickelt worden. Durch die inkrementelle Zugabe der kondensierenden Verbindung zur fluoreszenzmarkierten Nukleinsäure kann mit extrem niedrigem Substanzbedarf (200 - 250 ng) die Kondensation der Nukleinsäuren vermessen werden. Bei Durchführung in einem Mikroplattennachweissystem können 72 Kondensationsversuche innerhalb kürzester Zeit durchgeführt werden. Es können Reaktionsbedingungen analog zu Zellkulturprotokollen verwendet werden, so dass kein Problem durch Up- oder Downscaling des Versuchsansatzes von Fluoreszenzmessungen auf die Bedingungen, unter denen in der Zellkultur Transfektionsversuche durchgeführt werden, entstehen.

Die Kondensationsmessung mit kovalent fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden und mit Hybridoligonukleotide, eine neue Klasse genetischen Materials zur Konversion von Punktmutationen, ist entwickelt worden. Fluoreszenzmarkierung der Hybridoligonukleotide kann mit OliGreen™ oder RiboGreen™ erfolgen.

Eine Anpassung an die Hill-Funktion ermöglicht eine Quantifizierung des Kondensationseffekts. Wird Plasmid-DNA mit Protaminsulfat kondensiert, so ist im Vergleich zur Kondensation mit PEI die Kooperativität erhöht. Der Hill-Koeffizient, der die Neigung im abfallenden Abschnitt der Titrationskurve charakterisiert, ist weiterhin von der Menge der eingesetzten Nukleinsäure abhängig.

Die inkrementelle Nukleinsäurekondensation kann als analytisches Verfahren zur Charakterisierung von Nukleinsäuren oder den kondensierenden Genträgersystem verwendet werden. Es kann eine Quantifizierung der Kondensationseffizienz von verschiedenen Trägersystemen erfolgen.

Mikroskopische Untersuchungsverfahren für Liposomen und komplexierte Nukleinsäuren

9 Abbildende Rasterkraftmikroskopie* und Transmissionselektronenmikroskopie# von kationischen Lipiden und komplexierter Nukleinsäure

****in Zusammenarbeit mit G. Nelles* und H.-J. Butt***

Institut für Physikalische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

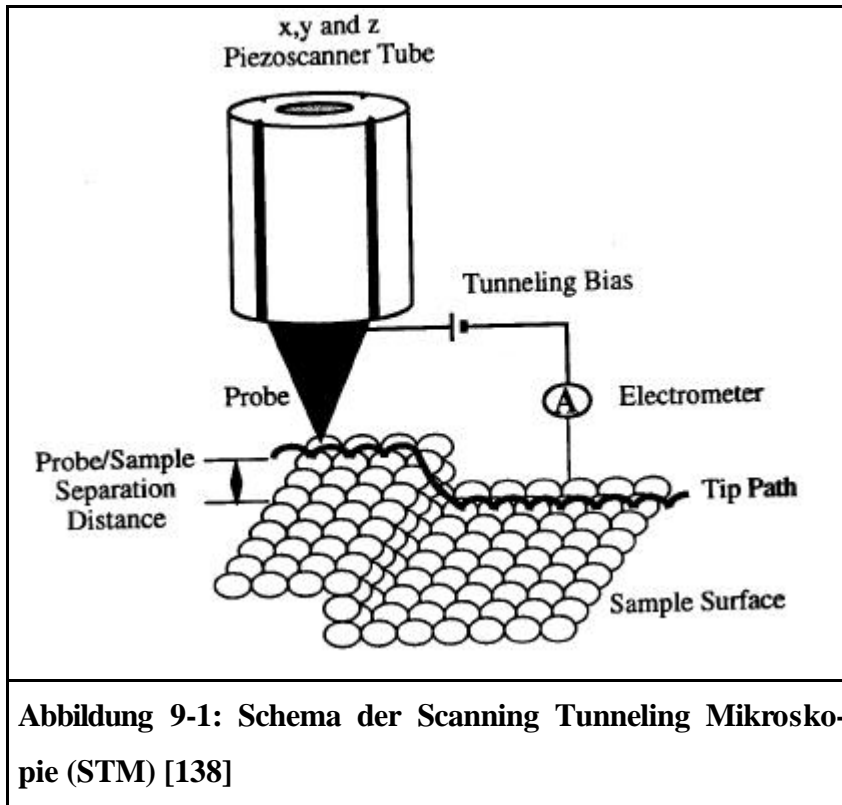
****jetzt: Sony Deutschland, Stuttgart***

#in Zusammenarbeit mit S. Heck

Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg

Einleitung

Rasterkraftmikroskopie



Die Atomic Force Microscopy (AFM) [synonyme Bezeichnungen: Rasterkraftmikroskopie; Scanning Force Microscopy (SFM)] ist ein mikroskopisches Verfahren aus der Gruppe der Scanning Probe-Mikroskopieverfahren (SPM) (Abbildung 9-1). Im Gegensatz zu den klassischen mikroskopischen Verfahren der Licht- und Elektronenmikroskopie wird bei dieser Gruppe von Mikroskopieverfahren die Oberfläche der zu untersuchenden Strukturen mit

einer scharfen Spitze abgetastet. Vorteil der Rasterkraftmikroskopie ist die Möglichkeit, dreidimensionale Strukturen der untersuchten Objekte sichtbar zu machen. Beim 1981 von Binnig et al. eingeführte Scanning Tunneling Microscope (STM) scannt eine leitende Spitze mit einem bestimmten Abstand über das leitende Material [139]. Wird eine Spannung zwischen Probe und Spitze angelegt, so fließt ein Tunnelstrom. Über einen Rückkopplungsmechanismus wird der Abstand der Spitze zur Probe konstant gehalten, so dass über die Auslenkung der Spitze Informationen über die topologische Gestalt der Probe erhalten werden können.

Beim AFM wird keine leitende Probe und Spitze benötigt. Die Spitze befindet sich am Ende einer Feder. Ein Laserstrahl wird auf die Spitze der Feder eingestellt. Auslenkungen der Feder führen zu einer Ablenkung des Laserstrahls, die zu einer Änderung der Lichtintensität führt, die den Rückkopplungsmechanismus zur Aufrechterhaltung des Abstands von Spitze zur Probe auslöst [140] (Abbildung 9-2). Es gibt verschiedene Meßmethoden (Abbildung 9-3):

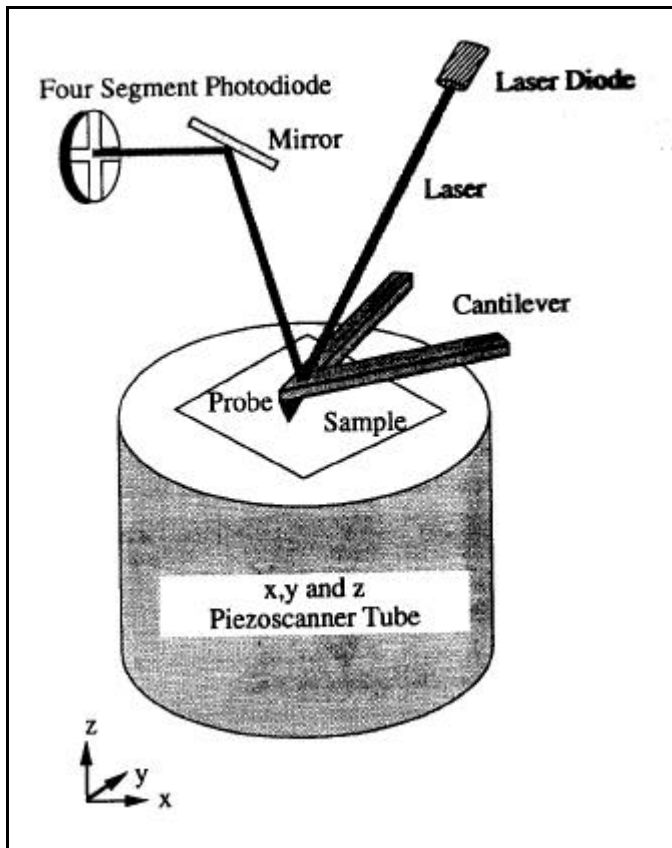


Abbildung 9-2:: Schematische Darstellung der Atomic Force Microscopy [138]

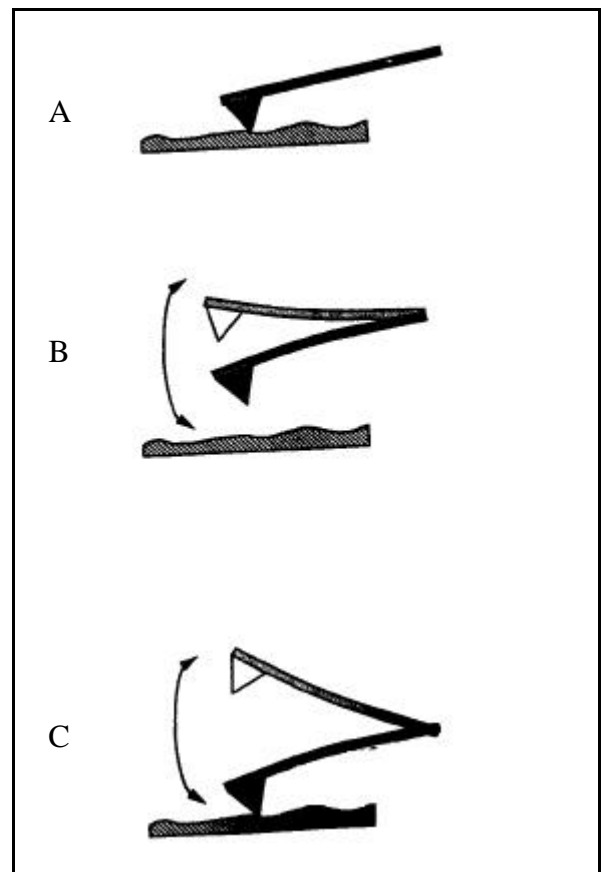


Abbildung 9-3: Messmodi der Rasterkraftmikroskopie: A) contact-mode, B) Non-contact mode C) TappingMode™ [138]

Beim *contact mode* bleibt der Abstand der Spitze zur Probe konstant, indem eine geringe Kraft auf die Feder ausgeübt wird, die größenordnungsmäßig im Bereich der Bindungskräfte von Atomen von 10^{-9} Newton liegt. Diese Kraft kann aber so groß sein, dass die Bindungskräfte, die die Struktur der Probe bedingen, überschritten werden, so dass die Probe dann durch die Messung zerstört werden kann. Desweiteren können laterale Scherkräfte weiche Proben von der Oberfläche verschieben. Besonders bei biologischem Material ist die Probe gegenüber den auftretenden Kräften nicht stabil. Desweiteren können nur locker gebundene Strukturen wie beispielsweise DNA durch die Spitze im contact-Modus verschoben werden.

Bei der *TappingMode™*-Technik oszilliert die Feder, die durch einen piezoelektrischen Kristall angeregt wird, in der Nähe der Resonanzfrequenz der Feder bei mehreren hundert kHz. Die Feder wird mit einer konstanten Kraft angeregt. Die Amplitude in Luft beträgt ca. 20 nm. Kommt die Spitze in Kontakt mit der Probe, so nimmt die Amplitude der Schwingung ab. Durch einen Rückkopplungsmechanismus wird der Abstand der Feder zur Probe wieder erhöht, indem der pie-

zoelektrische Scanner in z-Richtung bewegt wird. Bei dieser Technik ist die Spitze nur kurzzeitig in Kontakt mit der Probe. Folglich sind die dabei auftretenden Kräfte wesentlich geringer als bei der contact-Methode, so dass diese Methode für Proben verwendet werden muß, wenn im contact-Modus die Probe nicht stabil ist. Wird in Lösung gemessen, so wird die Flüssigkeitszelle zum Schwingen angeregt, da sonst die Flüssigkeit die Resonanzfrequenz der Feder zu stark dämpft [141].

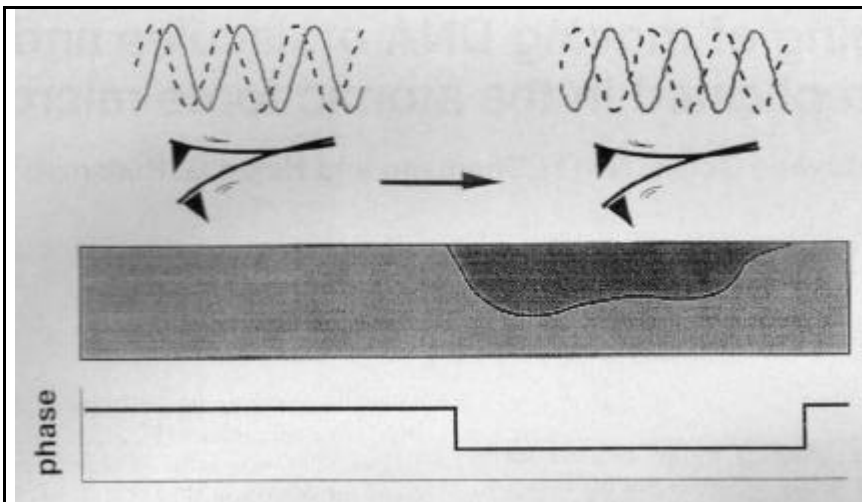


Abbildung 9-4: Phase-imaging in TappingMode™ [142]

Eine Erweiterung vom TappingMode™ ist das *Phase Imaging*. Es wird der Kontrast durch Unterschiede in der Oberflächenanziehung und Viskoelastizität verstärkt. Während im Höhenmodus im TappingMode™ Änderungen der Amplitude der Oszillation gemessen werden, können mit dem Extender™-Modul Änderungen

der Phase oder Resonanzfrequenz der Oszillation angezeigt und vom NanoScope controller aufgezeichnet werden (Abbildung 9-4). Es erfolgt also keine Abbildung der Oberfläche, sondern eine Darstellung des veränderten Schwingungsverhaltens der Feder in Abhängigkeit von der Topographie der Probe. Dabei werden besonders feine Strukturen hervorgehoben. Das Rauschen ist verringert und die Empfindlichkeit der Messung erhöht. Durch Erhöhen der Scangeschwindigkeit, Verringern der Kräfte und Verlangsamen der Reaktion des elektronischen Rückkopplungssystems auf Eigenschaften der Probenoberfläche ist die Abbildung eines Phasenbildes im TappingMode™ unter Bedingungen möglich, bei denen im Höhenmodus kein Kontrast mehr erzielt werden kann [143].

DNA-Abbildungen auf Graphit mit STM-Technik können Artefakte produzieren [144]. Fortschritte haben sich durch die Anwendung der AFM-Technik ergeben [145, 146]. Auch bei Abbildungen auf Glimmer ist unter bestimmten Voraussetzungen von einer Artefaktbildung berichtet worden [147, 148].

Für die Durchführung von AFM-Messungen muß ein Untergrund gewählt werden, dessen Höhenunterschiede wesentlich geringer sind als die Höhenunterschiede der zu vermessenden Probe. Glimmer kann in einzelnen atomaren Lagen gespalten werden und ist daher ein ideales Substrat für AFM-Untersuchungen [146], welches keine Artefakte produziert wie sie bei Abbildung auf Graphit gefunden wurden. Glimmer ist negativ geladen mit einer Ladungsdichte von einer negativen La-

dung pro 60 nm² [149]. Modifizierungen durch Silanisieren [150] oder spreiten der DNA auf kohlebeschichtetem Glimmer [151] wurden ebenfalls zur Abbildung von DNA verwendet. Abbildungen von DNA nach Trocknung können in Luft oder in Lösung ohne Zusatz von bindenden Ionen durchgeführt werden, während wässrige DNA-Lösungen nur in Gegenwart von Ni^{2+} abgebildet werden können [152].

Neben der stabilen Abbildung von DNA durch AFM ist es das Ziel weiterer Bemühungen, die Auflösung des DNA-Moleküls zu optimieren. Auf Magnesiumacetat-behandelten Glimmer konnte eine Auflösung von 10 nm erzielt werden, wobei die Kontrolle der absorbierten Feuchtigkeit zur Erzielung einer erhöhten Auflösung essentiell ist [145]. Mit Cytochrom-c-komplexierter DNA konnte auf kohlebeschichtetem Glimmer eine Auflösung von 6 nm erreicht werden [151]. Auf einem Bilayer aus kationischen Lipiden ist die Auflösung auf 2-3 nm optimiert worden [153]. Neue AFM-Techniken wie die Cryo-AFM [154] und MAC-Mode-AFM [155, 156] erweitern die Möglichkeiten für hochauflösende DNA-Abbildungen. Mit cryo-AFM konnte eine Auflösung von 3 nm erzielt werden [157]. Beim MAC-mode wird nicht die ganze Feder zum Schwingen angeregt, sondern es wird die Kraft magnetisch auf die Spitze übertragen, so dass „transducer“ und Probe fixiert bleiben. Das Ziel der Abbildung von Nukleinsäuren ist es, die Basenfolge der DNA aufzulösen, um die Sequenz von DNA-Fragmenten per AFM bestimmen zu können.

Die Rasterkraftmikroskopie ist eine geeignete Methode zur Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen DNA und den Trägersystemen für die Entwicklung von Gentherapeutika.

Komplexe von liposomal formulierten kationischen Cholesterolderivaten mit Plasmid-DNA zeigen sehr einheitliche kugelförmige Strukturen, bei denen keine plasmidähnliche Strukturen erkennbar sind [158]. LipofectinTM-DNA-Komplexe zeigen eine vernetzte Struktur. Mit einem Peptid mit Spezifität zum Integrin-Rezeptor erscheinen die Komplexe in Anwesenheit von LipofectinTM nicht vernetzt. Konstrukte aus DNA Peptiden mit Integrinrezeptorspezifität zeigen bei für Transfektionen optimalem Ladungsverhältnis Strukturen von kolloidaler Größe, während bei suboptimalem Ladungsverhältnis größere Strukturen nachgewiesen worden sind [159].

Ein nichtkationisches Transfektionssystem mit dicetylphosphathaltigen Liposomen zeigt mit STM auf goldbeschichtetem Glimmer in Anwesenheit von Calciumionen Strukturen, die sich über eine Anheftung der DNA an die äußere Lipidschicht des Bilayers vermittelt über Calciumionen erklären lassen [160].

Die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen DNA und Protamin ist neben der Entwicklung von Gentherapeutika auch für die Charakterisierung der Chromatinstruktur in Spermienzellen von Bedeutung. Mit linearisierter Plasmid-DNA konnte durch TappingModeTM-AFM in Luft gezeigt werden, dass die Strukturen von der Präparationsmethode abhängig sind. Bei Komplexierung

in Lösung wurde die Entstehung von Aggregaten gezeigt, während bei der Bindung von DNA auf Glimmer mit Magnesium und anschließender Zugabe von Protamin toroidale Strukturen entstehen. Nach der Vorbehandlung des Glimmers mit Protamin wird die zugegebene DNA in verschiedenen Stadien der Bildung von toroidalen Strukturen fixiert [161].

Magnesiumionen erhöhen die Bindung von DNA und komplexierter DNA auf Glimmer, andererseits kann das zweiwertige Kation aber auch die Wechselwirkung der DNA mit den kationischen Kondensationsreagentien beeinflussen. Daher ist die Durchführung von abbildenden AFM-Untersuchungen zur Charakterisierung von Genträgersystemen unter Bedingungen der "in-vitro-Kondensation" notwendig.

Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist durch eine einfache Probenpräparation gekennzeichnet. Die Liposomen oder komplexierte DNA oder nackte DNA wird auf ein Kupfernetz gegeben und mit PWS-Lösung oder UF-Lösung als Kontrastierungsmittel versetzt. Nach Bindung auf der ungeladenen Oberfläche wird die überstehende Flüssigkeit entfernt und das Präparat wird nach Anlegen des Vakuums im Elektronenstrahl betrachtet.

Präparationsartefakte, die durch Einfrieren oder Beschichten mit einer Goldschicht (notwendig für die Rasterelektronenmikroskopie) entstehen können, werden durch TEM vermieden.

Elektronenmikroskopie von DOTAP / PC nach Gefrierbruchpräparation zeigt neben Aggregation von Vesikeln oder Liposomen von helferlipidmodifizierten DOTAP-Komplexen auch Strukturen mit lipidumhüllten DNA-Strängen [115].

Mikroskopische Studien zeigen, dass die Polykationen Polylysin, Polyhistidin und Polyarginin DNA in stäbchenförmige oder „pfannenkuchen“-ähnliche Strukturen kondensieren. Poly-L-lysin soll eine geringere Toxizität aufweisen. Dieses Molekül ist bioabbaubar [87].

9.1 Messungen an Luft

Ergebnisse

9.1.1 Plasmid-DNA

Die Untersuchungen an Luft sind im TappingMode™ durchgeführt worden. Im contact-mode lassen sich Plasmid-DNA und die komplexierte DNA nicht abbilden.

In Abbildung 9-5 ist das pCMVlacZ-Plasmid dargestellt. Die Breite des DNA-Strangs be-

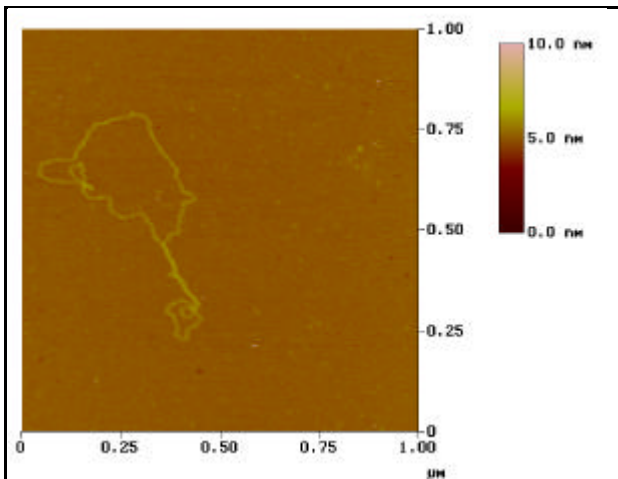


Abbildung 9-5: AFM-Abbildung von pCMVlacZ-Plasmid im TappingMode™ in Luft

trägt 24 nm, die Höhe 0,49 bis 0,85 nm. Das Plasmid ist ca. 2200 nm lang. Die theoretische Länge für das 7800 bp-Plasmid beträgt 2600 nm. Ein 3 kbp-Fragment in B-Form hat eine Länge von 1 µm [162]. Die Breite eines DNA-Doppelstranges beträgt 3 nm [163]. Das Plasmid liegt nicht mehr in einer überdrillten (supercoiled) Form vor, sondern in relaxierten (open circular) Zustand (s. Abbildung 12-2). Die Abbildung von Plasmid-DNA im überdrillten Zustand ist auch in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Durch Wechselwirkung mit dem Glimmer und Trocknung sowie Relaxierung wird die B-Form der Plasmid-DNA aufgelöst.

Die Länge der DNA-Struktur nimmt dadurch zu. Durch Hydratisierung ist die DNA um einen Faktor von 8 verbreitert.

9.1.2 Protaminsulfat-Plasmid-Komplexe

Die Abbildungen von Protaminsulfat-DNA-Komplexen sind mit 2 verschiedenen Inkubationsmethoden durchgeführt worden.

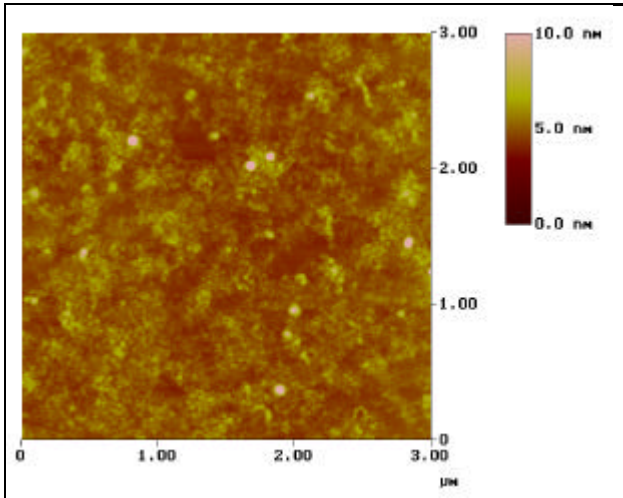


Abbildung 9-6: Protamin-DNA-Komplex nach Vorlage von Protaminsulfat (Methode A) in TappingMode™ in Luft

Wird zunächst Protaminsulfat auf Glimmer inkubiert und anschließend die DNA zugegeben (**Methode A** s. 3.5.2) so resultiert eine geordnete Struktur von Plasmid-DNA auf dem protaminbeschichteten Glimmer. Die DNA legt sich als fadenförmiges Molekül auf die kationisierte Oberfläche, wobei eine Auflösung der Feinstruktur der DNA nicht mehr möglich ist. Desweiteren sind kugelförmige Aggregate zu erkennen (Abbildung 9-6). Die Abbildung 9-7 zeigt die Abhängigkeit der Morphologie der Komplexe von dem angewendeten Ladungsverhältnis. Die Inkubationszeit

beträgt 6 Minuten. Bei einem Ladungsverhältnis von 1:1 (+/-) ist freie DNA zu erkennen. Von einer kompakten Struktur, die protaminkondensierte Nukleinsäure enthalten kann, gehen fädige Strukturen von DNA ab. Ein Ladungsverhältnis von 2,3:1 (+/-) zeigt den Übergang von freier, unkomplexierter DNA zu kompakten kolloidalen Strukturen. Bei einem Ladungsverhältnis von 11,6:1 (+/-) sind keine freien DNA-Stränge mehr nachweisbar. Stattdessen sind kompakte kugelförmige Strukturen, die sich zu Agglomeraten zusammenlagern, nachweisbar.

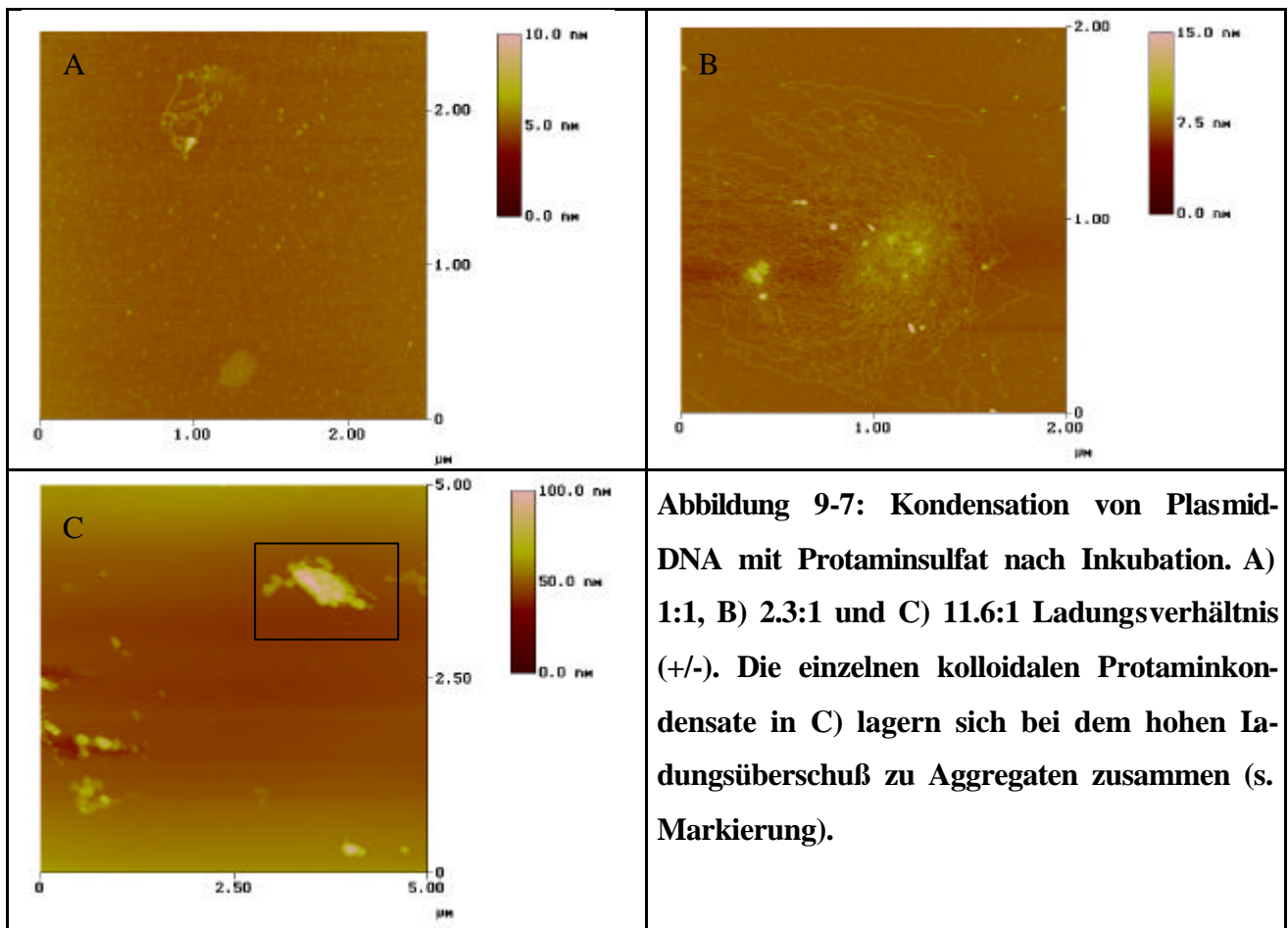


Abbildung 9-7: Kondensation von Plasmid-DNA mit Protaminsulfat nach Inkubation. A) 1:1, B) 2.3:1 und C) 11.6:1 Ladungsverhältnis (+/-). Die einzelnen kolloidalen Protaminkondensate in C) lagern sich bei dem hohen Ladungsüberschuß zu Aggregaten zusammen (s. Markierung).

9.1.3 Lipid-DNA-Komplexe

Obwohl Glimmer negativ geladen ist, sind DOTAP-Präparationen auf diesem stabil. Die Größe von DOTAP-Liposomen nimmt während der Inkubation auf Glimmer nicht zu.

Die Verwendung von kationischen Lipiden ist zur Optimierung der Auflösung von DNA-

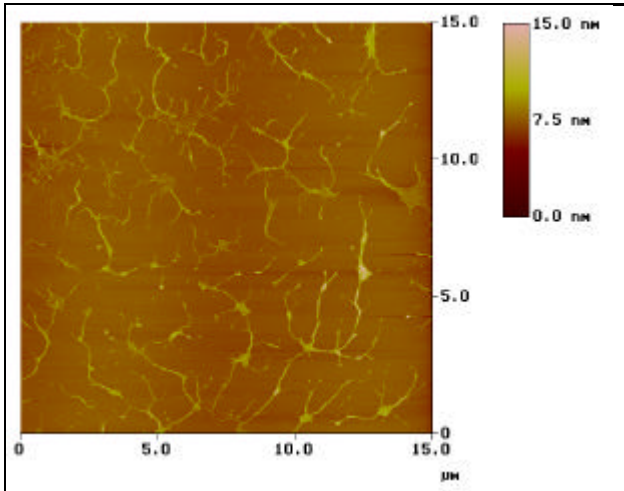


Abbildung 9-8: Vorlage von DOTAP, anschließend Zugabe von pCMVlacZ-Plasmid mit einem Ladungsverhältnis von 1:1 nach 2 Minuten Inkubation im TappingMode™ an Luft (Methode A)

Abbildungen beschrieben worden. Abbildung 9-8 zeigt die Struktur von **DNA-DOTAP-Komplexen** nach Vorlage von DOTAP (Methode A). Die DNA spreitet in fädige Strukturen auf dem Glimmer. Der Anteil der gebundenen DNA-Moleküle konnte durch die Vorlage von DOTAP im Vergleich zur reinen DNA erhöht werden. Es ist aber keine bessere Auflösung des DNA-Moleküls möglich. Neben relaxierten DNA-Strukturen sind auch flächige Gebilde zu erkennen, die aus DOTAP-Lipiden mit komplexierter Nukleinsäure bestehen können. Die Höhe der Strukturen ist kleiner 15 nm.

Wird Glimmer mit DOTAP kationisiert und darauf DOTAP-komplexierte DNA abgebildet

(Methode C, s. 3.5.2), so sind zahlreiche kugelförmige Strukturen erkennbar, aber keine fädigen Plasmidstrukturen nachweisbar (Abbildung 9-9). Komplexierte DNA kann sich sowohl eingekapselt in den Liposomen als auch in den unregelmäßig geformten Strukturen, die in der Abbildung mit einem Pfeil gekennzeichnet sind, befinden (Abbildung 9-9 B). Wird DOTAP auf DOTAP-kationisierten Glimmer abgebildet, so sind keine kugelförmigen, geordneten Strukturen erkennbar (Daten nicht gezeigt). Die Höhe der Strukturen beträgt maximal 20 nm, ist also wesentlich geringer als die erwartete Höhe von mehreren hundert nm. Die DOTAP-Strukturen sind so weich, dass sie auf dem Glimmer spreiten. Desweiteren wird durch den Trocknungsprozeß beim Ausblasen im Strom von Argon das Präparat so getrocknet, dass die Liposomen bzw. Lipid-DNA-Konstrukte einen Teil ihres wäßrigen Inhalts verlieren und kollabieren. Eine andere möglich Erklärung ist, dass die DNA-Lipid-Aggregate unter Zerstörung des Lipidbilayers entstehen und dabei das innere wäßrige Kompartiment der Liposomen verloren geht.

Werden die inkubierten DNA-DOTAP-Komplexe mit einem Ladungsverhältnis von 10:1

Probe	Z _{Ave} [nm]	s.d. [nm]
DOTAP 1:10	219.7	4.0
DOTAP 1:10 auf Glimmer	209.3	5.1
DOTAP auf Glimmer	215.1	11.0

Tabelle 9-1: Stabilität von DOTAP-Liposomen nach Inkubation auf Glimmer.
DOTAP 1:10 = 50 µl Liposomen 5 mg/ml werden zu 500 µl in bidestilliertem Wasser verdünnt, anschließend die Größe vermessen.; **DOTAP 1:10 auf Glimmer = 50 µl Liposomen 5 µg/ml** werden zu 500 µl mit bidestilliertem Wasser verdünnt, davon werden 50 µl auf frisch gespaltenen Glimmer gespreitet, 2 Minuten inkubiert, in Wasser aufgenommen, anschließend die Größe vermessen; **DOTAP auf Glimmer = 5 µl Liposomen 5 µg/ml** werden auf Glimmer gespreitet, dann 2 Minuten inkubiert und in Wasser aufgenommen, anschließend die Größe vermessen.

(+/-) auf frisch gespaltenen Glimmer abgebildet (Methode B), so ist in Abhängigkeit von der Inkubationszeit die Komplexierung der DNA nachweisbar. Nach 10 Minuten ist die Komplexbildungsreaktion noch nicht vollständig abgelaufen. Bei einem Ladungsverhältnis von 1:1 (+/-) sind fädige Strukturen nachweisbar (Abbildung 9-10 A), die bei einem Ladungsverhältnis von 10:1 (+/-) von Lipiden umgeben sind (Abbildung 9-10 B). Desweiteren sind bei einem hohen Ladungsüberschuß auch kugelförmige Strukturen nachweisbar. Diese befinden sich aber lokalisiert auf einem Untergrund aus Lipiden, aber nicht auf freiem Glimmer. Die Abbildung 9-10 B zeigt in der Übersicht den Film aus gespreitetem Lipid mit den darauf lokalisierten kugelförmigen Strukturen. In der Abbildung 9-10 C ist im Detail die Lipidinsel mit den kugelförmigen Lipidkonstrukten dargestellt. Die Höhe der Stufe zwischen Glimmer und der Lipidschicht beträgt 4 - 5 nm. Die Lipidkonstrukte

sind von kolloidaler Größe. Nach 30 – 45 Minuten zeigen sich immer noch Strukturen von nervenzellähnlicher Form, analog den Nervenzellen zusammengesetzt aus einem Soma und den fädigen Dendriten (Abbildung 9-10 D). Die fädigen Plasmidstrukturen sind von einer Lipidhülle umgeben. In der Abbildung 9-10 E ist eine 3-D-Ansicht dargestellt, die zeigt, wie die fadenförmigen Ausläufer sich im Soma vereinigen. Die Plasmide scheinen noch isoliert vorzuliegen und sich nicht zu überlappen. Das Soma könnte aus einem aufgeplatzten Liposom bestehen, von welchem sich die lipidumhüllte Plasmid-DNA sternförmig entfernt. Nach einer Inkubationszeit von über 4 Stunden ist wieder freie, nichtlipidumhüllte Plasmid-DNA zu erkennen (Abbildung 9-10 F). Der dargestellte Komplex scheint zu zerfallen und die DNA wieder freizugeben. Weiterhin sind aber noch kondensierte, kugelförmige kolloidale Strukturen erkennbar.

Werden DOTAP-Liposomen auf dem negativ geladenen Glimmer gespreitet und nach zweiminütiger Inkubation in Wasser aufgenommen und anschließend die Größe vermessen, so ist

keine signifikante Änderung der Liposomengröße nachweisbar. Durch die Inkubation der Liposomen auf dem Glimmer bleiben kolloidale Strukturen erhalten (Tabelle 9-1).

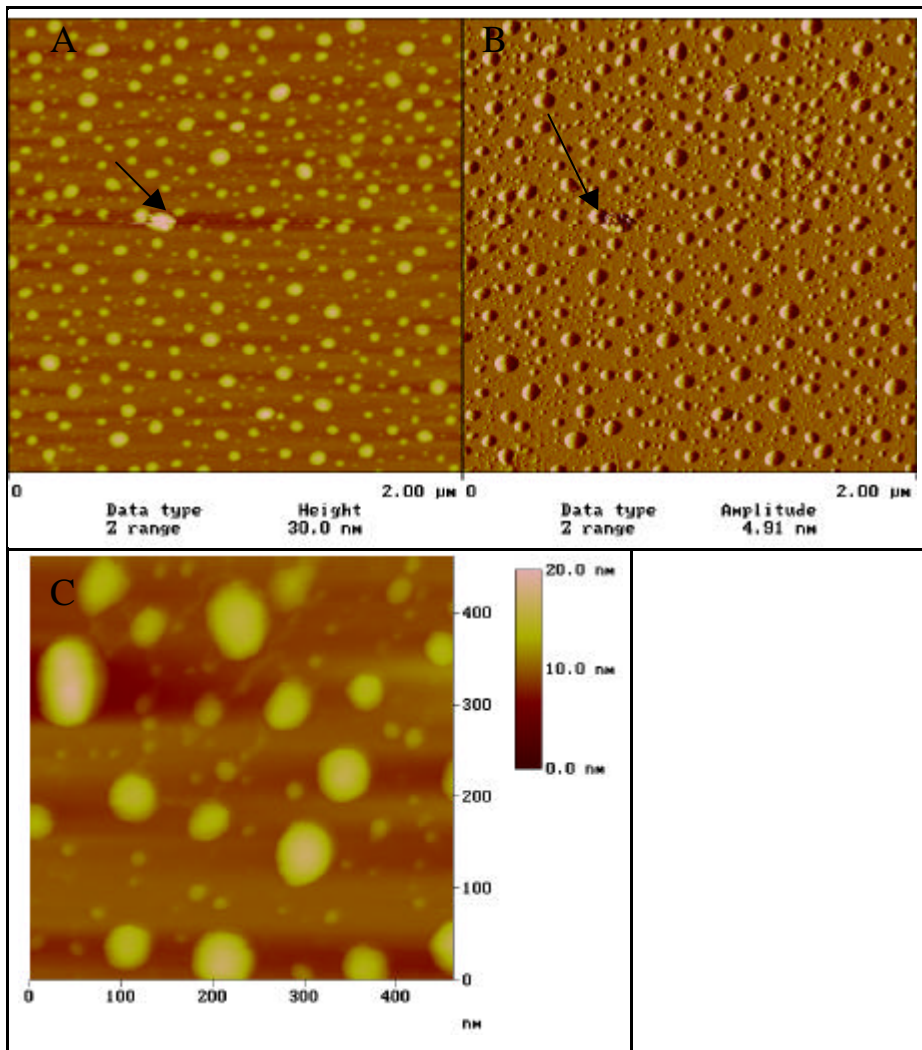


Abbildung 9-9: DNA-DOTAP (10:1 (+/-))-Komplexe auf mit DOTAP-kationisiertem Glimmer im TappingMode™ nach 10 minütiger Inkubation (Methode C) mit friction mode-Abbildung (B) Die Abbildung C zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus der Abbildung (A)

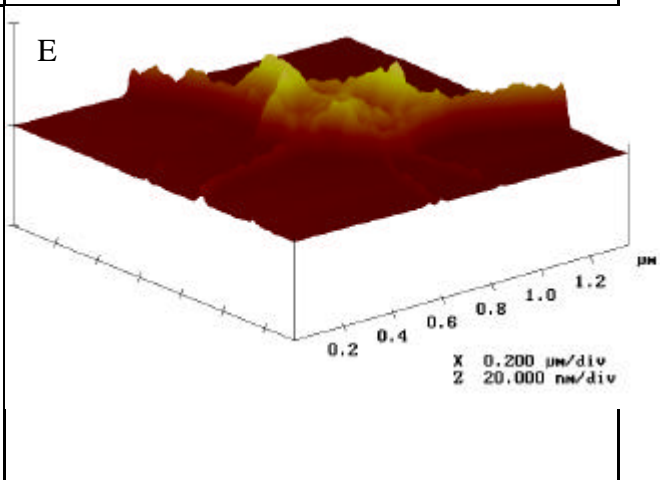
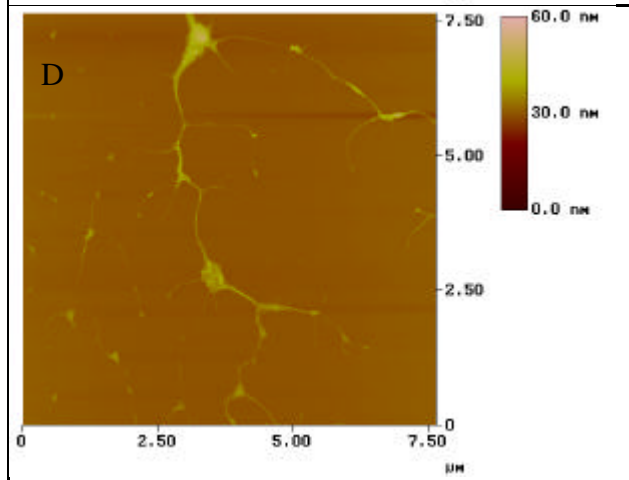
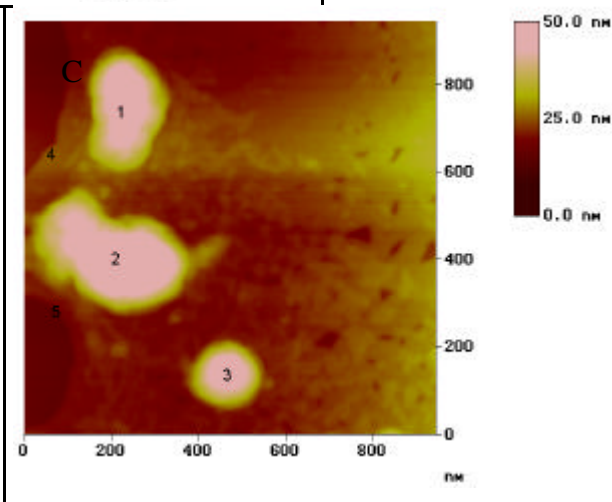
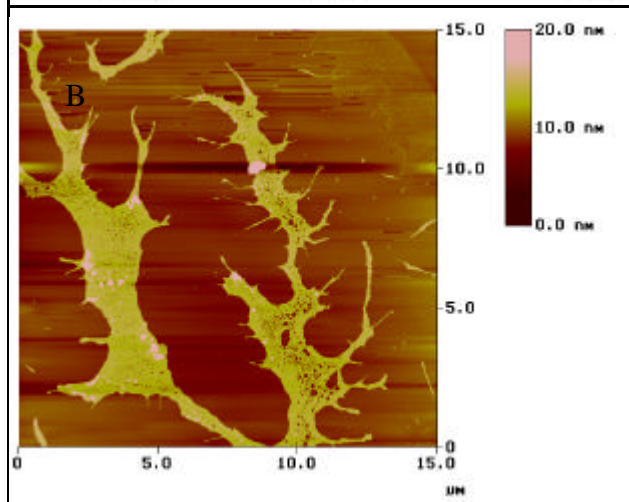
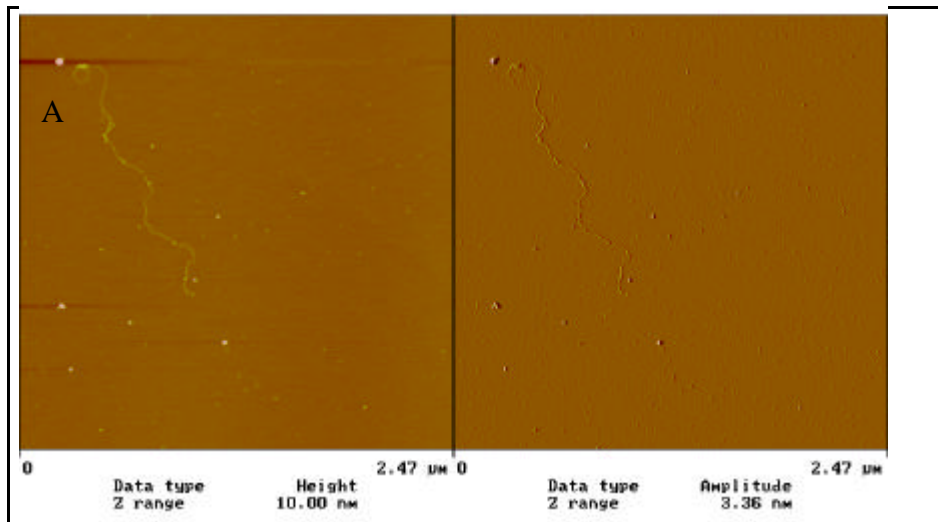


Abbildung 9-10: Komplexe von DOTAP mit Plasmid-DNA mit einem Ladungsverhältnis von 1:1 (+/-) (A) und bzw. 10:1 (+/-) (B-F) nach 10 Minuten (A-C), 30 Minuten (D-E) bzw. 255 Minuten (F), hergestellt nach Methode B

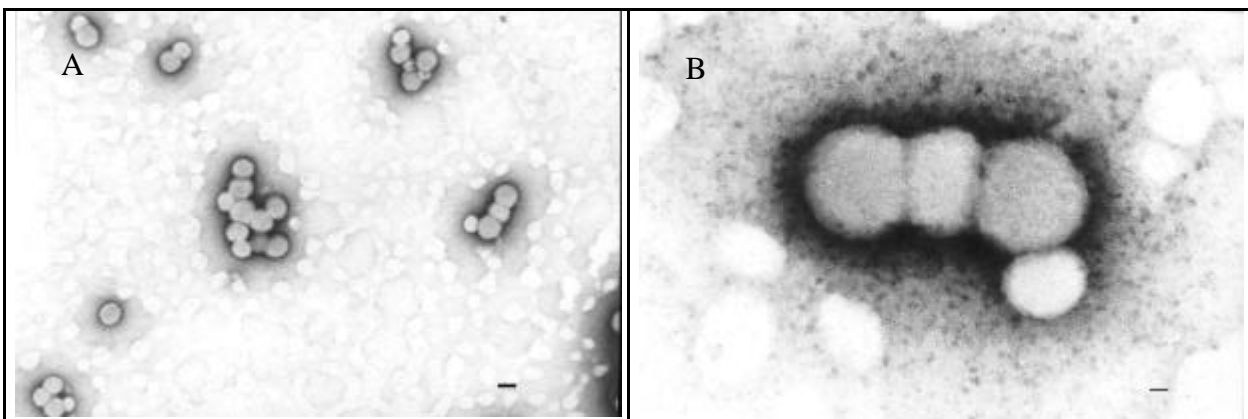
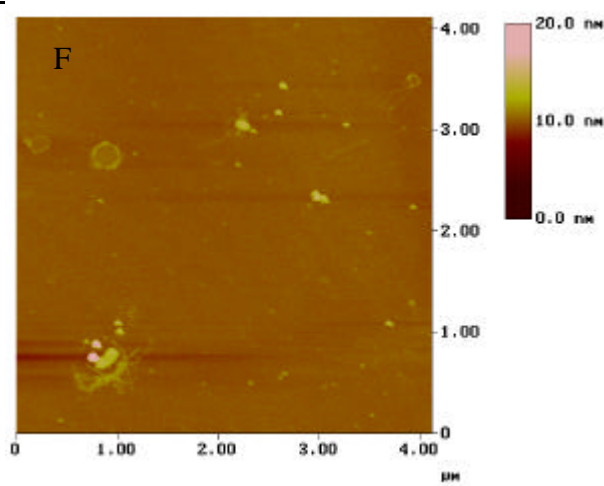


Abbildung 9-11: DOTAP / Plasmid-Komplex: DNA + DOTAP 1:10 (50.000 X links und 250.000 X rechts). Der Maßstab ist 50 nm (A) bzw. 10 nm (B) lang.

In der Abbildung 9-11 ist die elektronenmikroskopische Aufnahme von DOTAP-komplexierter Plasmid-DNA dargestellt. Die kugelförmigen Liposomen lagern sich zu Aggregaten zusammen. Die zusammengelagerten Aggregate sind an den Orten der Zusammenlagerung abgeflacht. An den Kontaktstellen der Liposomen kann sich die Nukleinsäure umhüllt von den kationischen Lipiden befinden. Freie DNA ist sowohl in dieser Abbildung als auch in Präparationen von nackter DNA mit TEM nicht darstellbar.

Desweiteren sind mehrere auf kationischen Lipiden basierende Transfektionssysteme durch Abbildung mittels AFM im TappingMode™ in Luft untersucht worden. **DOTAP / DOPE-Plasmid-Komplexe** zeigen Strukturen, die den DOTAP-Plasmid-Komplexen sehr ähnlich sehen. Auch hier ist ein Soma zu erkennen, auf welchem kugelförmige Strukturen lokalisiert sind. Die 3-D-Ansicht zeigt, dass die Plasmid-Stränge noch einzeln vorliegen und im Soma –wiederum evtl. durch ein aufgeplatztes Liposom- zusammengehalten werden (Abbildung 9-12). Kolloidale kompakte Strukturen sind sowohl auf dem Lipidfilm (A) als auch auf dem Glimmer zu erkennen, wobei

die lipidlokalisierten Kugelstrukturen kleiner sind als die glimmerlokalisierten kolloiden Kugelstrukturen.

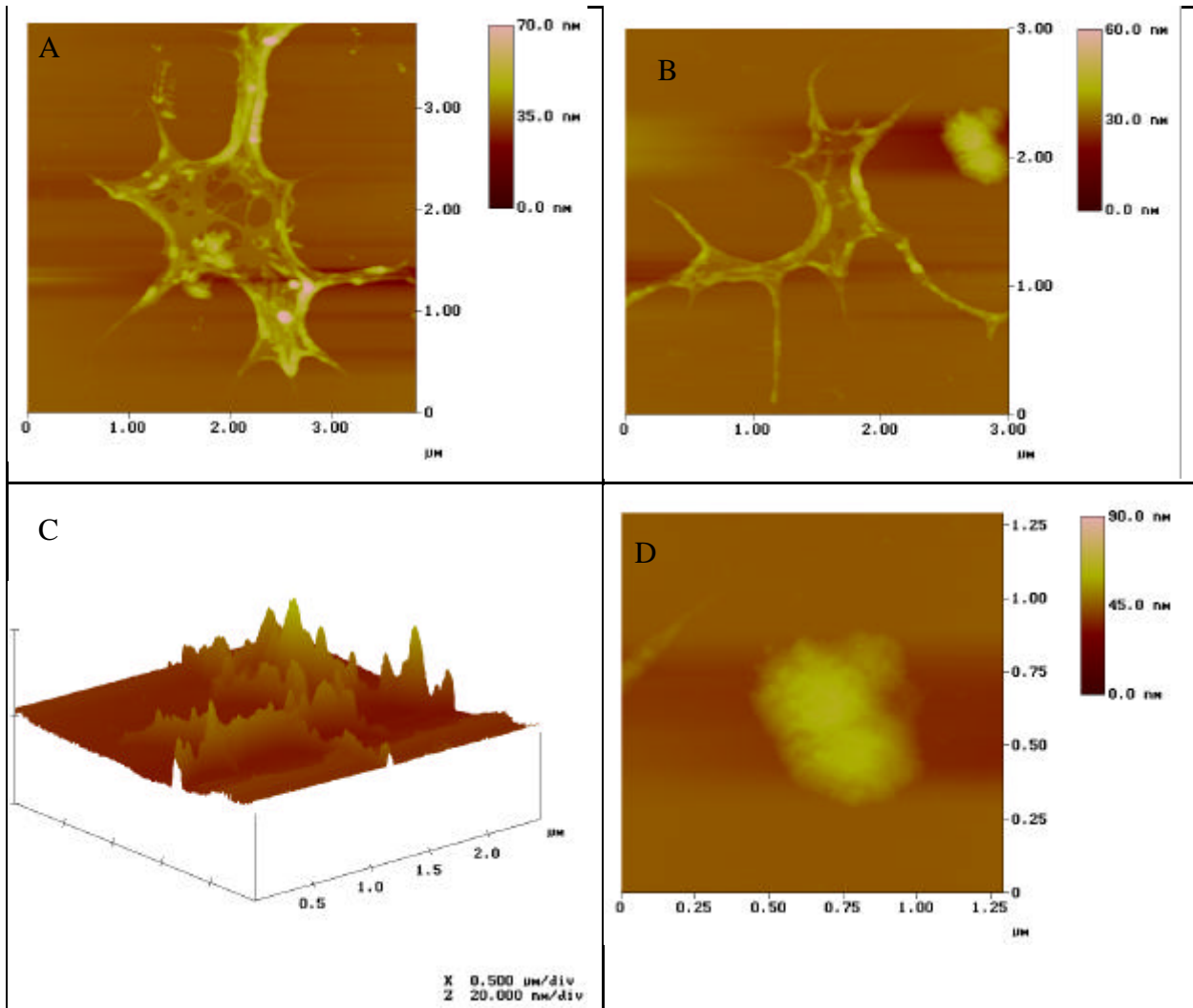


Abbildung 9-12: Kondensation von Plasmid-DNA mit DOTAP/DOPE (10:1 +/-) nach 10 minütiger Inkubation (Methode B). A) und B) sind 2 verschiedene Komplexe. C) ist eine 3D-Ansicht des Komplexes B), in D) ist eine Ausschnitt aus B) dargestellt

Für **DOTAP / Chol-Plasmid-Komplexe** wird im Vergleich zu DOTAP-Formulierungen ei-

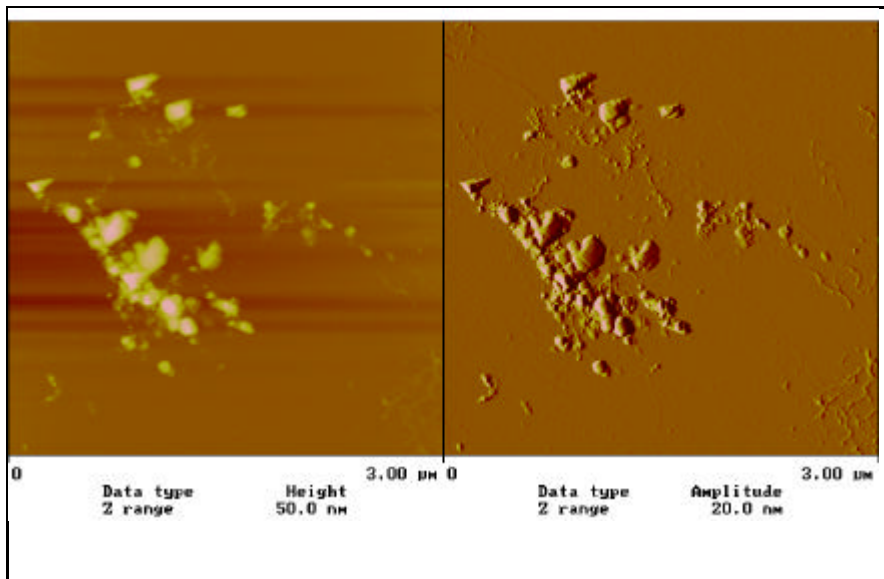
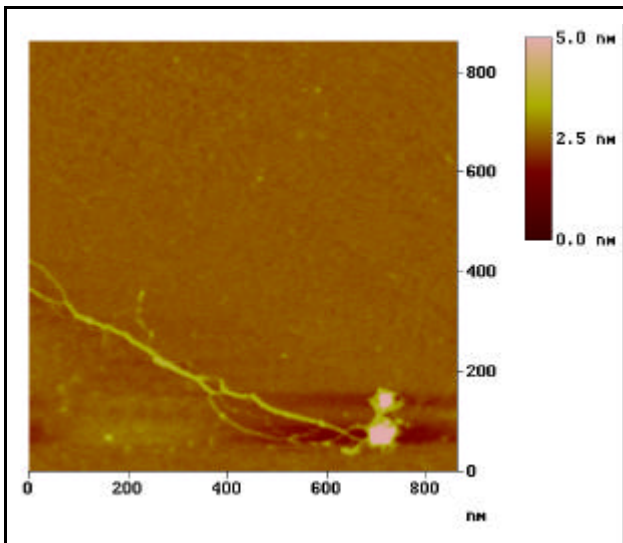


Abbildung 9-13: Plasmid-DOTAP/Chol-Komplexe nach 10 minütiger Inkubation mit einem Ladungsverhältnis von 10:1 (+/-) und Vorlage von DOTAP / Chol (Methode C)

ne Erhöhung der Transfektionseffizienz berichtet [164, 165]. Bei einem Ladungsverhältnis von 10:1 sind kompakte kolloidale Strukturen nachweisbar sind (Abbildung 9-13). Die Strukturen von DOTAP/Chol-Plasmid-Konstrukten zeigen bei einem Überschuß an kationischer Ladung im Vergleich zu DOTAP Präparationen in Richtung der z-Achse höhere Strukturen. Auch erscheinen

hier die Konstrukte kugelförmig. Die Ausbildung von nervenzellförmigen Komplexen konnte nicht gezeigt werden. Es sind eher kugelförmige Strukturen von kolloidaler Dimension nachweisbar, die sich bei der Abbildung in Luft zu größeren Aggregaten zusammenlagern. Im Friction-Modus sind auch noch fadenförmige Strukturen erkennbar, bei denen es sich um freie Plasmid-DNA handeln könnte (Abbildung 9-13 C).

In Abbildung 9-14 ist die Aggregation von **Plasmid-DNA mit EiPC**-Liposomen dargestellt.



Das Präparat zeigt Lipidaggregate sowie langgestreckte Plasmid-DNA. Die Plasmid-DNA ist im Gegensatz zu kationischen Lipiden nicht direkt mit den Lipiden aggregiert. Es sind keine von den Lipidinseln auslaufenden Plasmidstränge erkennbar. Die Anlagerung des Plasmids erfolgt nicht sternförmig wie bei den Präparationen mit kationischen Lipiden. Die Anlagerung der DNA an die Lipidinseln ist mit hydrophoben Wechselwirkungen des lipidumhüllten Plasmidstranges erklärbar.

Abbildung 9-14: Aggregation von Plasmid-DNA mit EiPC. Die EiPC-Menge entspricht bei einer virtuellen Ladung von +1 / Molekül einem Ladungsverhältnis von 10:1 (+/-)

9.1.4 AVE™ & protaminkondensierte DNA

Eine Präparation von Protaminsulfat-DNA-Komplexen, die mit AVE™ gemischt worden sind, ist in Abbildung 9-15 dargestellt. In Bild A) der Abbildung ist ein Strang freier DNA erkennbar. In Bild B) ist eine Struktur dargestellt, die aus protaminkondensierter Plasmid-DNA besteht.

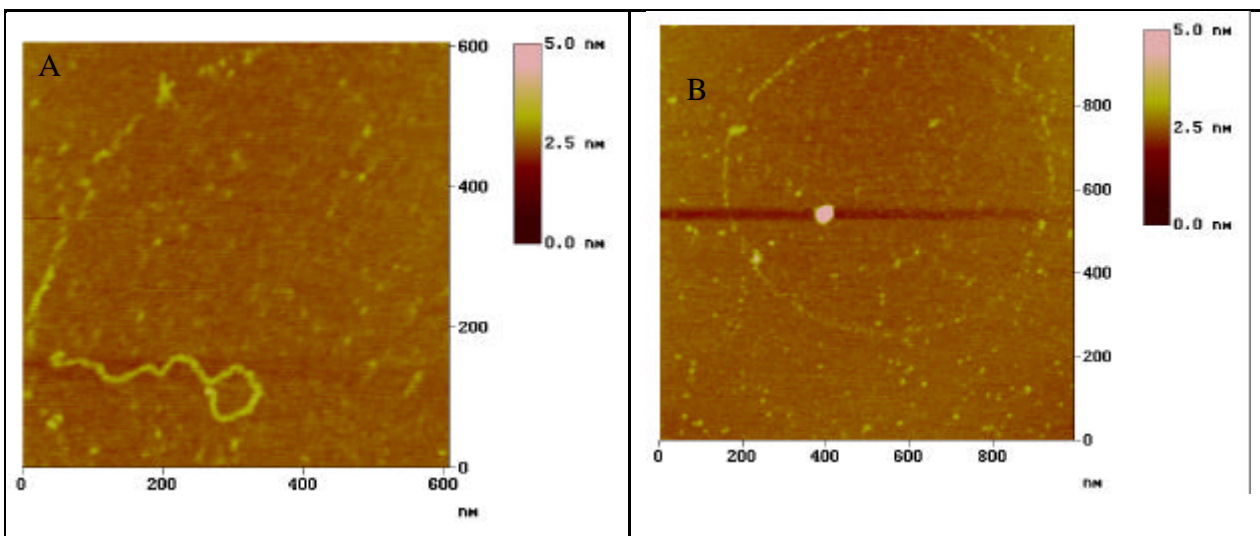


Abbildung 9-15: AFM von AVE™ mit PS und Plasmid HS. A) DNA; B) protaminkondensierte Plasmid-DNA

Eine Umhüllung der DNA-Komplexe mit Lipiden der AVE ist sowohl in A) als auch in B) nicht erkennbar. Die kreisförmige Struktur, die die DNA bzw. den Komplex umgibt, ist durch die Trocknung des Präparates im Strom von Argongas entstanden und könnte die Lipide der negativ geladenen Liposomen enthalten, die sich während der Trocknung auf dem Glimmer niedergeschlagen haben. Aufgrund der Fluidität der Lipide lassen sich die Liposomen in dem Präparat nicht abbilden. Bei der körnigen Struktur auf dem Untergrund kann es sich die Lipide handeln. Durch das Eintauchen der Spitze in die Liposomen haften diese an der Spitze fest und werden beim Abscannen des Präparates zu einer anderen Stelle transportiert und dort wieder niedergelegt.

Werden die umhüllten Komplexe elektronenmikroskopisch abgebildet, so sind zum einen die DNA-Komplexe und die Lipide in der Formulierung zu erkennen. In Abbildung 9-16 A) und B) ist die Bilayer-Struktur der Liposomen erkennbar. Schwarze Strukturen innerhalb der Liposomen können lipidumhüllte DNA-Komplexe darstellen. In den Abbildung 9-16 C - E) sind Aggregate von protaminkondensierter Plasmid-DNA ohne umhüllende Liposomen dargestellt. Diese ähneln den reinen Plasmid-Protamin-Komplexen (Abbildung 9-16 F). Mit AFM konnten ebenfalls freie, nicht-lipidumhüllte Aggregate nachgewiesen werden (Abbildung 9-7 C).

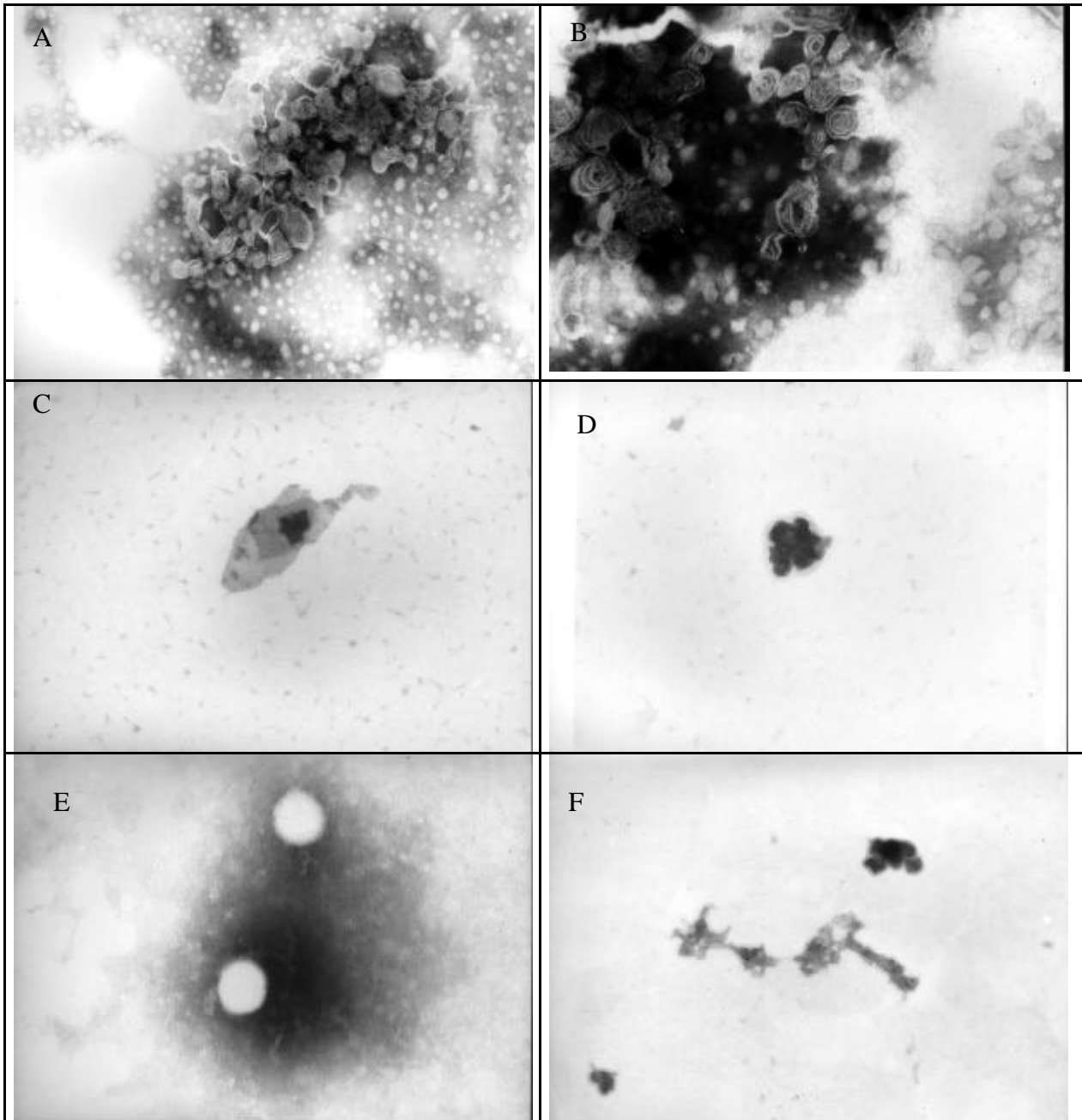


Abbildung 9-16: TEM-Aufnahmen von protaminkondensierter DNA (HS-Plasmid), die mit AVE™ umhüllt worden sind (A-E) und protaminkondensiertes pCMVlacZ-Plasmid (F) mit einem Ladungsverhältnis von 5:1 (+/-). Vergrößerungen: A) 50 000 X; B-F) 85 000 X

Diskussion

Das Ziel der Untersuchungen ist

die Darstellung der Strukturen von Plasmid-DNA-Komplexen und

die Homogenität / Heterogenität der verwendeten Transfektionssysteme zu charakterisieren

Es konnte für **protaminsulfatkomplexierte DNA** gezeigt werden, dass mit zunehmendem Ladungsverhältnis zunehmend kompakte Strukturen entstehen. Während bei einem Ladungsverhältnis von 1:1 (+/-) und 2.6:1 (+/-) noch deutlich freie Plasmid-DNA zu erkennen ist, sind bei einem hohen Ladungsüberschuß kompakte Strukturen von kolloidaler Größenordnung nachweisbar. Diese Komplexe lagern sich unter AFM-Abbildung zu größeren Aggregaten zusammen. Auch in einer Formulierung von AVE-umhüllten protaminkondensierter Plasmid-DNA war sowohl freie als auch komplexierte DNA nachweisbar. Die AFM-Untersuchungen zeigen, dass Protamin-Plasmid-DNA in verschieden strukturierte Komponenten kondensiert. AFM ist geeignet, diese unterschiedlichen kondensierten Strukturen darzustellen.

Während bei protaminkondensierten Plasmiden die Strukturen innerhalb einer Population homogen erscheinen, zeigen **lipidkondensierte Plasmide** heterogenere Strukturen.

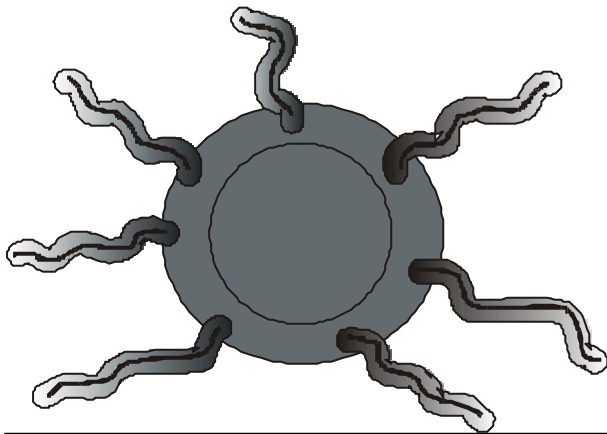


Abbildung 9-17: Modell von DOTAP-komplexierter Plasmid-DNA. Um eine zentrale Lipidstruktur lagern sich die lipidumhüllten DNA-Stränge an.

Bei **DOTAP**-komplexierter DNA sind zwei verschiedene strukturelle Komponenten nachweisbar. Neben nervenzellförmigen Strukturen mit einem Durchmesser im Mikrometerbereich befinden sich überwiegend auf den gespreiteten Lipidstrukturen auf Glimmer auch kugelförmige Konstrukte. Da ohne DNA diese Gebilde nicht nachweisbar sind, können diese kugelförmigen Gebilde nur als DNA-DOTAP-Konstrukte interpretiert werden. Eine Auflösung der Strukturen in Lipidanteil und DNA-Anteil ist nicht möglich. Das Lipid-DNA-Konstrukt ist zu weich, um die Oberflächenstruktur aufzulösen.

Die nervenzellförmigen DOTAP-DNA-Konstrukte zeigen, dass die DNA-Stränge einzeln vorliegen und in einem zentralen Liposom zusammenlaufen, ohne durch die kationischen Lipide direkt miteinander verbunden zu werden. In Luft spreiten die DNA-Fäden und die Liposomen auf Glimmer zu mehreren Mikrometer großen zweidimensionalen Strukturen. Geht man davon aus, dass in Lösung die fadenförmigen DNA-Moleküle sich frei orientieren können,

dann befinden sich die lipidumhüllten DNA-Moleküle auf der Oberfläche von einzelnen Liposomen. Die Komplexbildung läuft in 2 Stufen ab. In der 1. Stufe zerplatzen einige Liposomen unter Umhüllung der Plasmid-DNA. In der 2. Stufe lagern sich die hydrophoben DNA-Konstrukte an die bei kationischem Ladungsüberschuß noch vorhandenen Liposomen an. Dieses Modell wird dadurch unterstützt, dass bei neutralem Ladungsverhältnis von kationischem Lipid zu DNA nur lipidumhüllte DNA nachweisbar ist, die fadenförmigen Lipid-DNA-Aggregate sich aber niemals zentral in einem Liposom vereinigen. Die Lipidumhüllung kommt durch Zerplatzen von Liposomen beim Kontakt mit Plasmid-DNA durch elektrostatische Wechselwirkung zustande. Die freien Lipid oder Lipidaggregate lagern sich aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung an die DNA und führen dadurch zum Neutralisieren der negativen DNA-Ladung. Die neutralen oder kationischen DNA-Lipid-Konstrukte lagern sich dann aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung der Lipidschwänze der kationischen Lipide an die freien Liposomen in der Lösung an. Die entstehenden Liposomen-Lipid/DNA-Aggregate sind somit größer als DOTAP-Liposomen. ***DOTAP/DOPE*** zeigen ebenfalls nervenzellähnliche Strukturen. Das Helferlipid DOPE hat somit keinen Einfluß auf die Morphologie der Komplexe. Es unterstützt aber die Freisetzung der komplexierten DNA in der Zelle.

DOTAP- und DOTAP / DOPE-Liposomen sind aufgrund der Fettsäuren fluide Formulierungen. Durch den Einbau von Cholesterol oder die Verwendung von gesättigten TAP-Derivaten kann die Fluidität der Formulierungen vermindert werden, so dass ein Spreiten auf der Glimmeroberfläche reduziert werden kann.

DOTAP/Chol-Liposomen zeigen bei überschüssiger kationischer Ladung kompakte kolloidale Strukturen. Nervenzellähnliche Strukturen sind hier nicht darstellbar. Durch das membranstabilisierende Cholesterol wird das Spreiten der Lipide auf dem Glimmer reduziert. Dadurch werden kompaktere Strukturen erhalten, die sich aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zu größeren Aggregaten zusammenlagern. Durch die verminderte Fluidität können sich lipidumhüllte DNA-Fäden nicht an DOTAP / Chol-Liposomen anlagern, um große nervenzellförmige Aggregate zu bilden.

Untersuchungen zur Stabilität von kationischen Liposomen auf Glimmer zeigen, daß die Liposomen nach zweiminütiger Absorptionszeit zumindest zu einem bestimmten Anteil stabil sind. Aufgrund des Substanzbedarfs für die PCS war es allerdings notwendig, bedeutend größere Mengen der Liposomen für den Spreitungsversuch einzusetzen im Vergleich zu den AFM-Abbildungen. Es ist möglich, dass ein Teil der Liposomen auf dem Glimmer spreitet, sich eine lipidgesättigte Oberfläche ausbildet, auf der dann überschüssige Liposomen stabil durch hydrophobe Wechselwirkung bestehen bleiben. Dieser Befund steht in Einklang mit den Abbildungen von Komplexen auf kationisiertem Glimmer (s. Abbildung 9-9). Auch hier kann sich eine hydrophobe Schicht kationischer

Lipide ausgebreitet haben, so dass auf dem "Lipidsee" entweder freie Liposomen oder Lipoplexe "schwimmen".

9.2 Darstellung von kationischen Liposomen und Lipoplexen in der Lösungsmittelzelle

Ergebnisse

Um die Komplexe in ihrem natürlichen Medium zu messen, werden die liposomalen Formulierungen sowie Lipoplexe in der Flüssigkeitszelle abgebildet. Der Einfluß der Rigidität der Lipidmembran auf die Abbildbarkeit der Liposomen und Lipoplexe wird untersucht.

DMTAP und **DMTAP/Chol**-Liposomen sind im *TappingMode*TM nicht abbildbar.

Die Abbildung von **DMTAP/Chol-Liposomen** in der Flüssigkeitszelle ist nur im *contact*

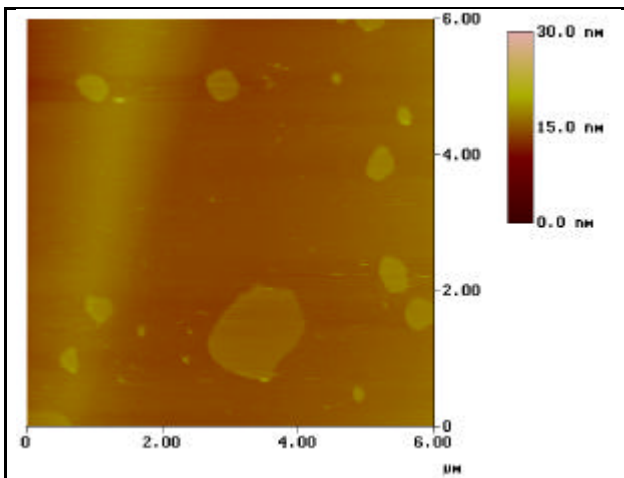


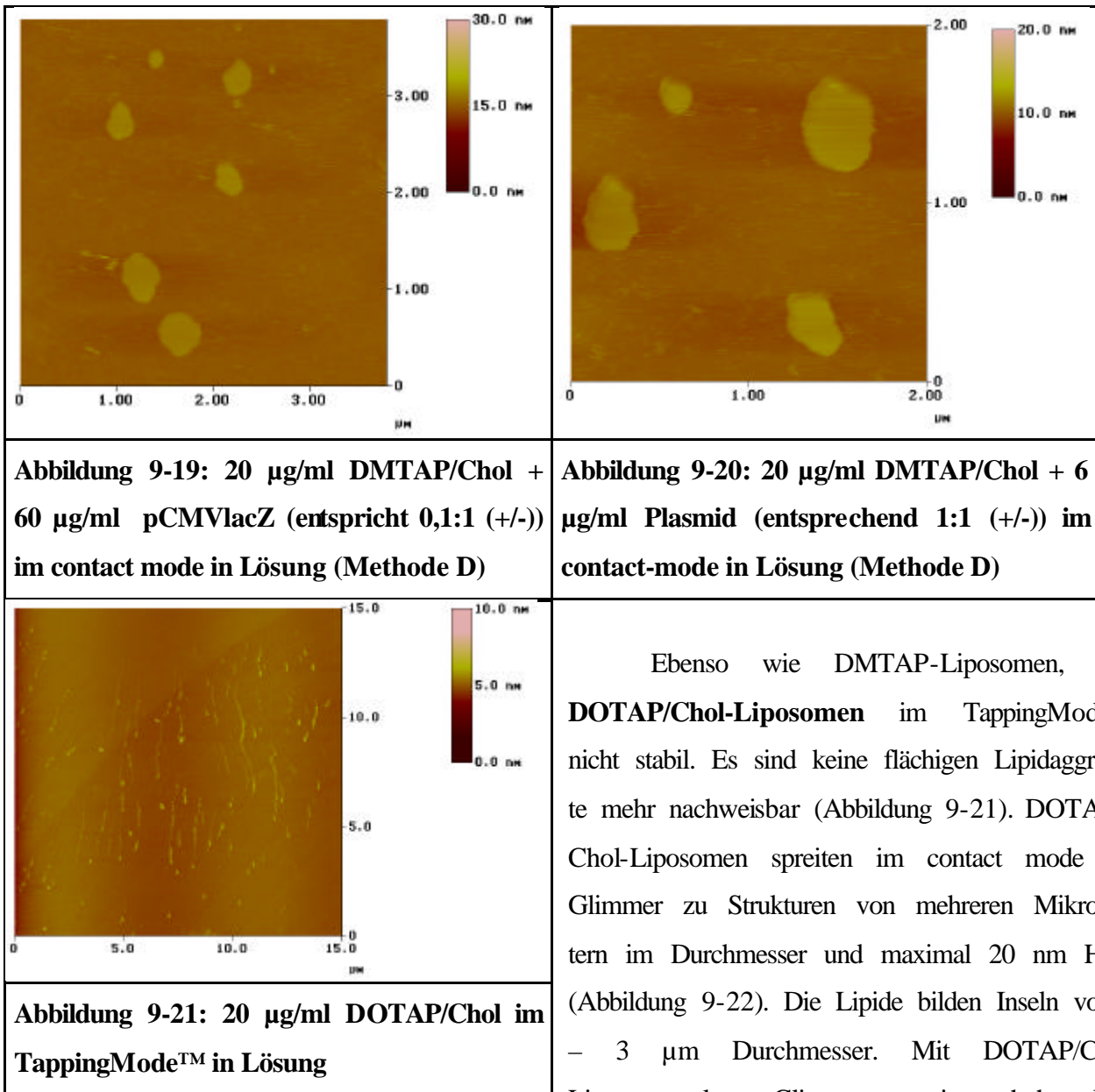
Abbildung 9-18: 20 µg/ml DMTAP-Chol im contact-mode in Lösung

mode möglich. Die DMTAP/Chol-Liposomen spreiten auf der Glimmeroberfläche zu flachen, flächigen Strukturen von bis zu 1,5 µm Durchmesser. Die Höhe der Strukturen beträgt ca. 20 nm (Abbildung 9-18).

Werden *negativ geladene Plasmid-DMTAP/Chol-Komplexe* im contact mode abgebildet, so sind neben den flächigen Lipidstrukturen, die sich nicht von den Strukturen der reinen Lipide unterscheiden, zusätzlich noch fadenförmige Strukturen, die als Plasmid-DNA interpretiert werden können, sichtbar (Abbildung 9-19). Die

DNA ist nicht mit den kationischen Lipiden assoziiert, sondern seitlich von den Lipidstrukturen versetzt. Es ist möglich dass die Nukleinsäuren an der durch das Eintauchen in die Lipide kationisierte AFM-Feder haften und dann seitlich versetzt auf dem Glimmer sich wieder von der Feder getrennt haben.

Neutrale Komplexe von **DMTAP/Chol** und **Plasmid-DNA** bilden flächige Strukturen ohne Feinstrukturen, die sich als DNA-Fäden interpretieren lassen können. Beim Ladungsverhältnis von 1:1 ist keine freie DNA nachweisbar (Abbildung 9-20).



Wird DNA zugegeben, so sind immer noch die flachen Lipidfilme nachweisbar. Allerdings konnte im contact mode auch keine Bindung der DNA an den Lipidfilm gezeigt werden.

DSTAP / Chol stellt eine noch rigidere Lipidkomposition dar. Diese Formulierung kann im TappingMode™ zu flächigen Gebilden gespreitet werden. Bei Zugabe von DNA ist keine Bindung von DNA an die Lipidmembran nachweisbar. Die Höhe der Lipidmembran beträgt 2.9 nm.

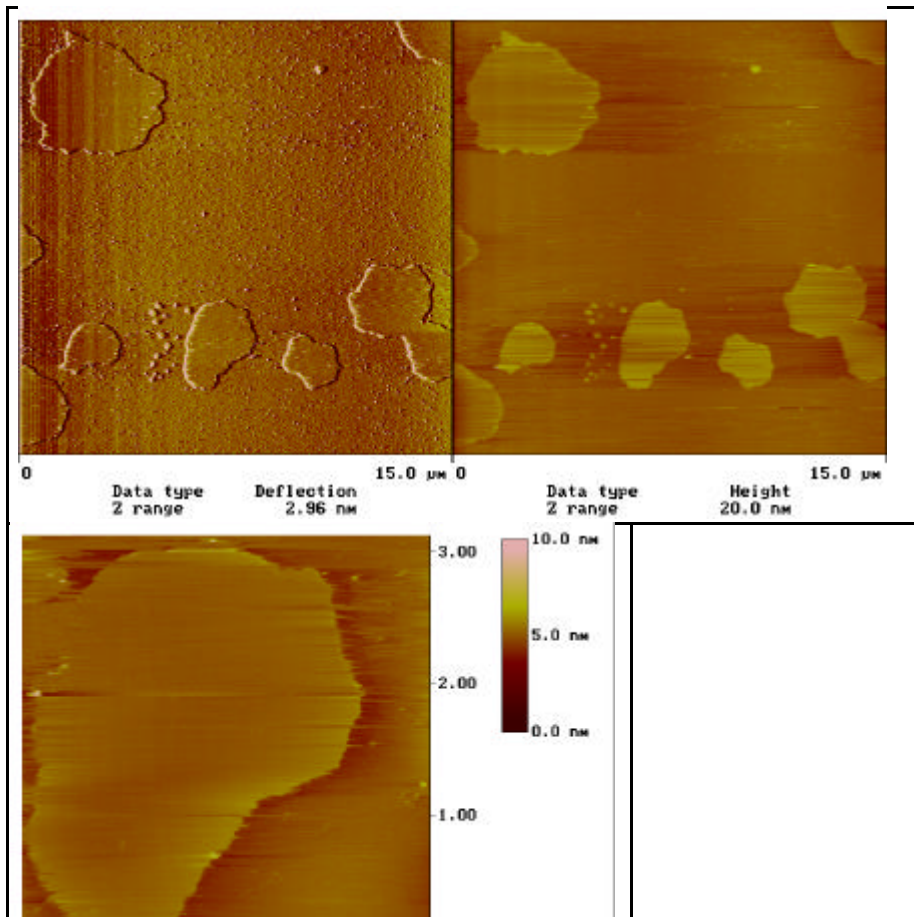


Abbildung 9-22: 20 μg/ml DOTAP / Chol im contact mode in Lösung

Werden **DSTAP** / Chol-Liposomen im TappingMode™ abgebildet, so sind flächige Strukturen von ca. 1 – 2 μm Durchmesser darstellbar.

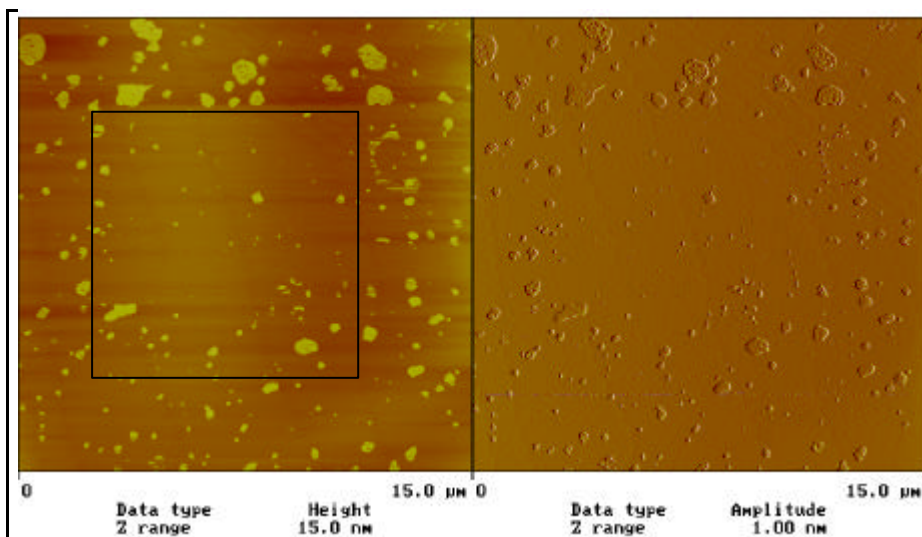


Abbildung 9-23: 20 μg/ml DSTAP / Chol im TappingMode™ in Lösung. Im zentralen 10 x 10 μm² großen Feld (Quadrat) sind nur wenig Lipidstrukturen zu finden, weil durch ein vorheriges Abtasten der Oberfläche die Lipide verschoben worden sind.

Wird eine Stelle in dem Präparat mehrfach abgescannt, so erfolgt ein Transport des Materials mit der Feder. Im linken Teil der Abbildung ist zentral eine 10 x 10 μm² großes Feld erkennbar, in welchem durch mehrfaches Abtasten der Oberfläche ein

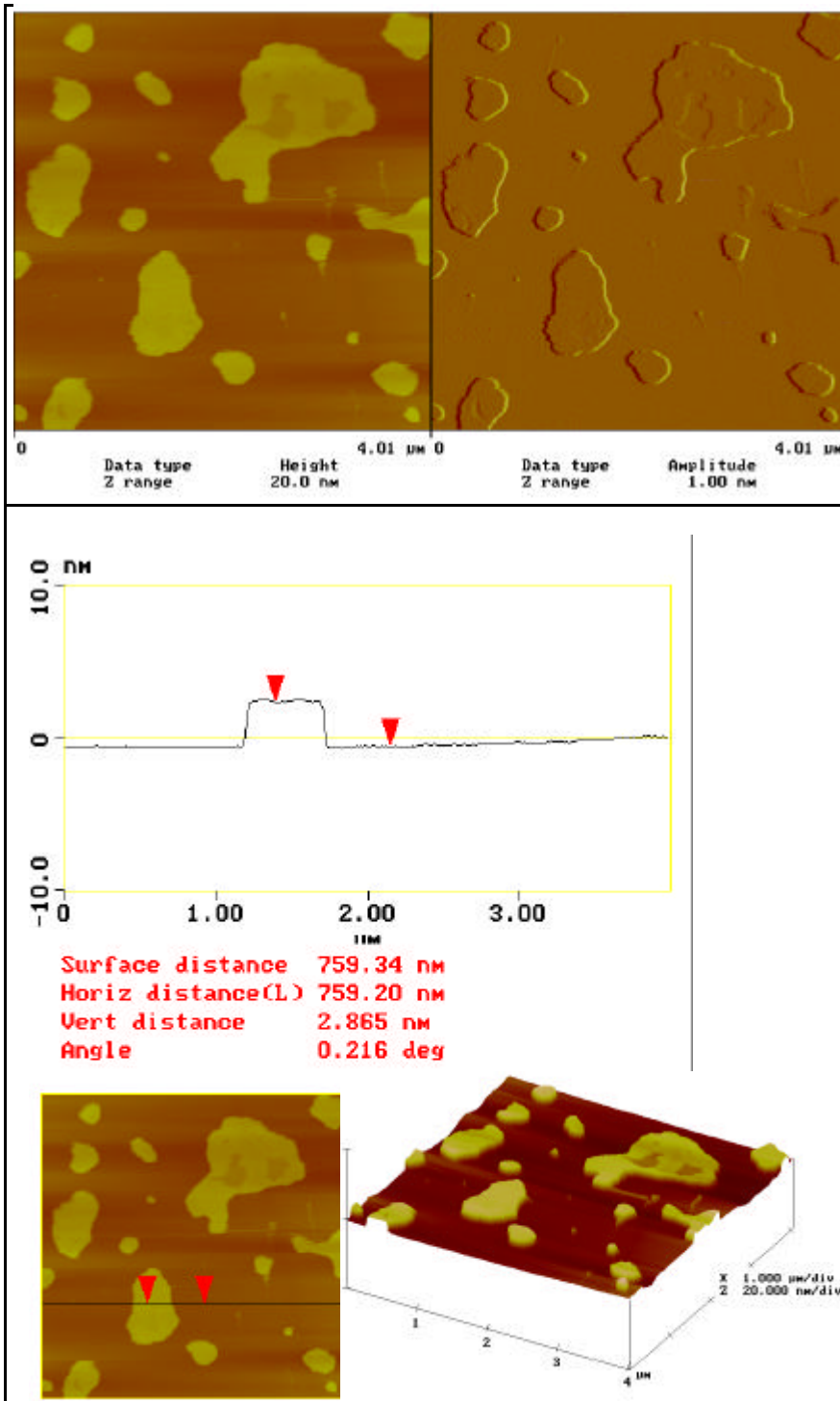


Abbildung 9-24: Abbildung von DSTAP/Chol-Plasmid auf DSTAP/Chol-modifiziertem Glimmer. 20 μg/ml DSTAP-Chol + DSTAP/Chol 10 μg/ml / Plasmid-DNA 100 μg/ml in Lösung im TappingMode™ (Methode D)

Präparat verteilt worden sind.

quadratisches Feld ausgestanzt worden ist. Deshalb darf nicht mehrfach über eine definierte Stelle im Präparat mit DSTAP/Chol-Liposomen abgescannt werden, wenn eine homogene Belegung des Glimmers mit den kationischen Lipiden erfolgen soll.

DSTAP-Chol-Plasmid-DNA in der Lösungszelle zeigt ebenfalls eine flächige Darstellung der Lipide (Abbildung 9-24). DNA-Strukturen sind nicht auflösbar. Die Lipidstrukturen können die Nukleinsäure inkorporiert enthalten. Weiterhin sind einige fadenförmige Strukturen, die Nukleinsäure enthalten können, vorhanden. Die Höhe der Lipidinseln beträgt ca. 3 nm. Fädige Strukturen können Plasmid-DNA darstellen, die nicht mit den kationischen Lipiden assoziiert ist. Es kann sich bei diesen Strukturen aber ebenso um losgelöste Lipidstrukturen handeln, die mit der AFM-Spitze über das

Diskussion

Fluide DOTAP-Liposomen lassen sich in der Flüssigkeitszelle sowohl im contact-mode als auch im TappingMode™ nicht abbilden. Bei Erhöhung der Rigidität der Lipidmembran durch Verwendung von *gesättigten TAP*-Derivaten und den Einbau von Cholesterol ist es möglich, die Liposomen auf Glimmer abzubilden, wobei die Liposomen auf Glimmer spreiten, so dass ein lipophiler Untergrund erhalten wird, auf dem analog zu den Messungen an Luft DNA-Liposomen-Komplexe unter nativen Bedingungen abgebildet werden können. Es lassen sich die Liposomen besser im contact-mode als im TappingMode™ abbilden. Normalerweise ist der contact-mode für biologische Proben wenig geeignet, weil die weichen Strukturen für eine Abbildung keine genügende Stabilität aufweisen. Die sehr rigiden DSTAP/Chol-Liposomen lassen sich im TappingMode™ abbilden. Allerdings konnte Plasmid-DNA nicht auf diesem Untergrund gebunden werden, was evtl. auch mit der geringen Flexibilität der Fettsäuren oder durch den Einbau von Cholesterol in die Lipidmembran erklärt werden kann, so dass die DNA nicht mit der kationischen Kopfgruppe von DSTAP in Wechselwirkung treten kann. Die Höhe der Lipidfilme beträgt ca. 3 nm. Diese Höhe entspricht der Höhe eines Lipidbilayers.

Rigide Lipidstrukturen mit gesättigten Fettsäuren unter Zusatz von Cholesterol spreiten auf Glimmer und bilden einen kationischen lipophilen Untergrund. Ein Fortschritt kann durch die Kationisierung des Glimmers erzielt werden. Ein homogener Lipidfilm auf dem Glimmer vermindert die Gefahr artifizieller Strukturen durch direkte Wechselwirkungen mit dem Glimmer. DSTAP / Chol-Lipide sind für den TappingMode™ in Lösung zur Bildung eines Lipidfilms geeignet, während DOTAP/Chol für Untersuchungen im contact mode zusammenhängende Lipidstrukturen ausbildet.

Zusammenfassung

Die Rasterkraftmikroskopie ist ein neues analytisches Verfahren, welches zur Charakterisierung von Genträgersystemen verwendet werden kann. Durch Abbildungen in Luft konnten ladungsabhängige Strukturmodifikationen von protaminsulfat-komplexierten Nukleinsäuren aufgezeigt werden. Ein hoher Ladungsüberschuß (11,6:1 +/-) führt zu kompakten, kolloidalen Strukturen, während bei Verwendung neutraler Komplexe noch freie Nukleinsäuren in dem System vorhanden sind. Die Stabilität von DOTAP-Plasmid-Komplexen ist zeitabhängig. Die nach 10 Minuten und 30 Minuten vollständig kondensierte Nukleinsäure wird nach Inkubationszeiten von > 4 Stunden wieder freigesetzt.

Eine Optimierung von rasterkraftmikroskopischen Abbildungen von komplexierten Nukleinsäuren ist möglich durch Messung in Lösung. Da die Lipide auf dem Untergrund spreiten, ist eine Beschichtung des Glimmers, dem Substrat auf dem die Messungen durchgeführt wurden, mit kationischen Lipiden notwendig. Eine Beschichtung von Glimmer ist mit cholesterolhaltigen Formulierungen von TAP-Derivaten (DMTAP; DSTAP) möglich.

10 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

10.1 Nuclear transport of oligonucleotides in HepG2-cells mediated by protamine sulfate and negatively charged liposomes

C. Welz^{*}, W. Neuhuber[#], H. Schreier⁺, M. Metzler[§], R. Repp[§], W. Rascher[§] and A. Fahr^{*}

^{}Department of Pharmaceutics and Biopharmacy, Philipps-University Marburg, Germany; Departments of [#]Anatomy and [§]Pediatrics, Friedrich-Alexander-University, Erlangen, Germany; ⁺H. Schreier Consulting, Sebastopol, CA, USA*

Summary

The aim of this study was to characterise the intracellular distribution and nuclear uptake of oligonucleotides (ON) that were complexed with protamine sulfate (PS) and artificial viral envelopes. Double-fluorescence labelling of oligonucleic acid and liposomal lipid was applied to monitor simultaneously the interaction as well as the individual fate of active agent and carrier upon intracellular delivery using confocal laser scanning microscopy (CLSM). A DNA-analogue of a 68-mer intramolecular double-stranded RNA:DNA-hybrid-oligonucleotide with an unmodified phosphate backbone was employed. This construct was condensed with PS and coated with a liposomal formulation (AVETM-3 = artificial viral envelope). PS-ON-complexes and AVETM-3-coated complexes with a defined composition were found to be effective in nuclear transport of ON.

Zusammenfassung

Das Ziel der Studie war die Charakterisierung der intrazellulären Verteilung von Oligonukleotiden, insbesondere deren Aufnahme in den Zellkern. Die Oligonukleotide waren mit Protaminsulfat und "artificial viral envelops" komplexiert. Zweifachfluoreszenzmarkierung von Oligonukleotiden und liposomal formulierten Lipiden wurde angewendet, um gleichzeitig sowohl Wechselwirkung als auch Schicksal der einzelnen aktiven Agentien und des Trägersystems mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie zu verfolgen. Ein DNA-Analogon eines 68-mer RNA:DNA-Hybridoligonukleotids, welches intramolekular einen Doppelstrang bildet, und einem unmodifizierten Phosphat-Rückgrat wurde verwendet. Dieses Konstrukt wurde mit Protaminsulfat kondensiert und mit der liposomalen Formulierung AVETM-3 umhüllt. Die Effektivität von Protaminsulfat-Oligonukleotid-Komplexen und AVETM-3 umhüllten Komplexen mit einer definierten Zusammensetzung als Trägersysteme für einen Zellkerntransport von Oligonukleotiden wurde nachgewiesen.

Key Words

oligonucleotide, protamine sulfate, artificial viral envelope, confocal laser scanning microscopy

Abbreviations

AVE = artificial viral envelope, DABCO = Diazabicyclo[2.2.2]octane, CLSM = confocal laser scanning microscopy, Rh-DOPE = LissamineTM-rhodamine B-1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt; DOTMA = N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride; DOPE = dioleoylphosphatidylethanolamine; DOTAP = N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chlorid; EPC = egg-phosphatidylcholine; FCS = fetal calf serum; ON = oligonucleotide; PBS = phosphate buffered saline; PS = protamine sulfate; PVA = polyvinylalcohol

Introduction

Recently, 15- to 28-mer oligonucleotides (ON) have been employed which interact with target DNA or RNA in the nucleus or cytoplasm of the cell [36]. More recently, Kmiec and co-workers [44, 47] proposed to use double-stranded 68-mer chimeric RNA:DNA-ON to target genomic DNA in the nucleus with the aim of repairing single point mutations as they occur in various genetic diseases such as sickle cell anemia and others. Whereas for antisense strategy a cytoplasmic localisation of ON may be sufficient, repairing of genome point mutation requires nuclear transport of the genetic constructs. The ON employed in this study is a 68-mer molecule with two Thairpin-loops and complementary base structures thus forming an intramolecular double-strand as shown in figure 2-1.

Cellular uptake of ON is highly inefficient as their net negative charge and high molecular weight prohibit efficient transfer across cell membranes without the help of carrier systems [76]. When ON were applied to cells as a solution, they were only found in the cytoplasm, whereas after complexation with cationic lipids (DOTMA, DOTMA/DOPE or DOTAP) [166] or microinjection of fluorescently labeled ON, localisation in the nucleus as well as diffuse localisation in the cytoplasm was observed [167].

Although cationic liposomal formulations are widely used as gene delivery systems, they lack the transfection efficiency of viral vectors. In addition, they interact non-specifically and highly promiscuously with (negatively charged) vascular walls as well as serum components. Alternative carrier systems that are being explored include anionic liposomes, pH-sensitive liposomes, immunoliposomes, or fusogenic liposomes to deliver ON or modified ON into cells [36]. Artificial viral envelopes (AVE™) are liposomal formulations with a composition that is derived from the composition of viral envelopes [102]. For instance, the HIV-1 viral envelope is composed of approximately equimolar amounts of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, and sphingomyelin with an equimolar ratio of cholesterol (Chol) to total phospholipid [168]. Artificial viral envelopes (AVE) have fusogenic properties, allowing them to transport encapsulated or associated drugs into cells [169].

Anionic liposome delivery systems are less cytotoxic to cells in vitro than synthetic cationic gene delivery systems (unpublished results). However, in order to achieve acceptable encapsulation/complexation efficiencies, ON either require to be complexed with cationic agents such [170] as Ca^{2+} or need to be encapsulated into the aqueous interior of fusogenic or pH-sensitive liposomes [171]. Complexation with cationic agents, e.g. poly-L-lysine [172, 173] causes DNA to be neutralised and to collapse into a compact colloidal structure which can be efficiently coated and taken up

into cells. Another promising condensing agent is protamine, which packs DNA in sperm cells. Protamine can be harvested from several fish species and is available in pharmaceutical grade commercially [91]. Protamine has been reported to enhance cellular uptake of RNA and DNA [93-95] and, more recently, has been shown to enhance the effectiveness of cationic lipid-mediated transfer of plasmids [96].

In our study, we have condensed an ON with PS and coated this complex with a negatively charged rhodamine-labeled liposomal formulation (AVE™-3). Cellular distribution of the ON and the carrier, with a wide range of PS-DNA charge ratios, was investigated in HepG2 cells following the kinetics of this process using confocal laser microscopy.

Results

The uptake of naked ON over the entire observation period of 1 to 21 hours is rather weak as only small amounts of fluorescence label can be found in the cytoplasm of the cells and appears to be attributed to granule structures (Fig. 10-1). No fluorescence was detectable in the nucleus.

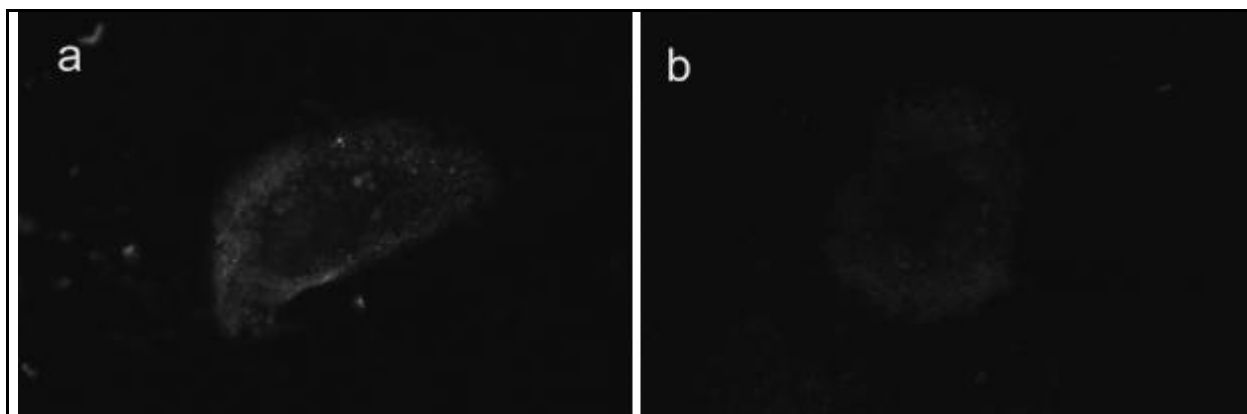
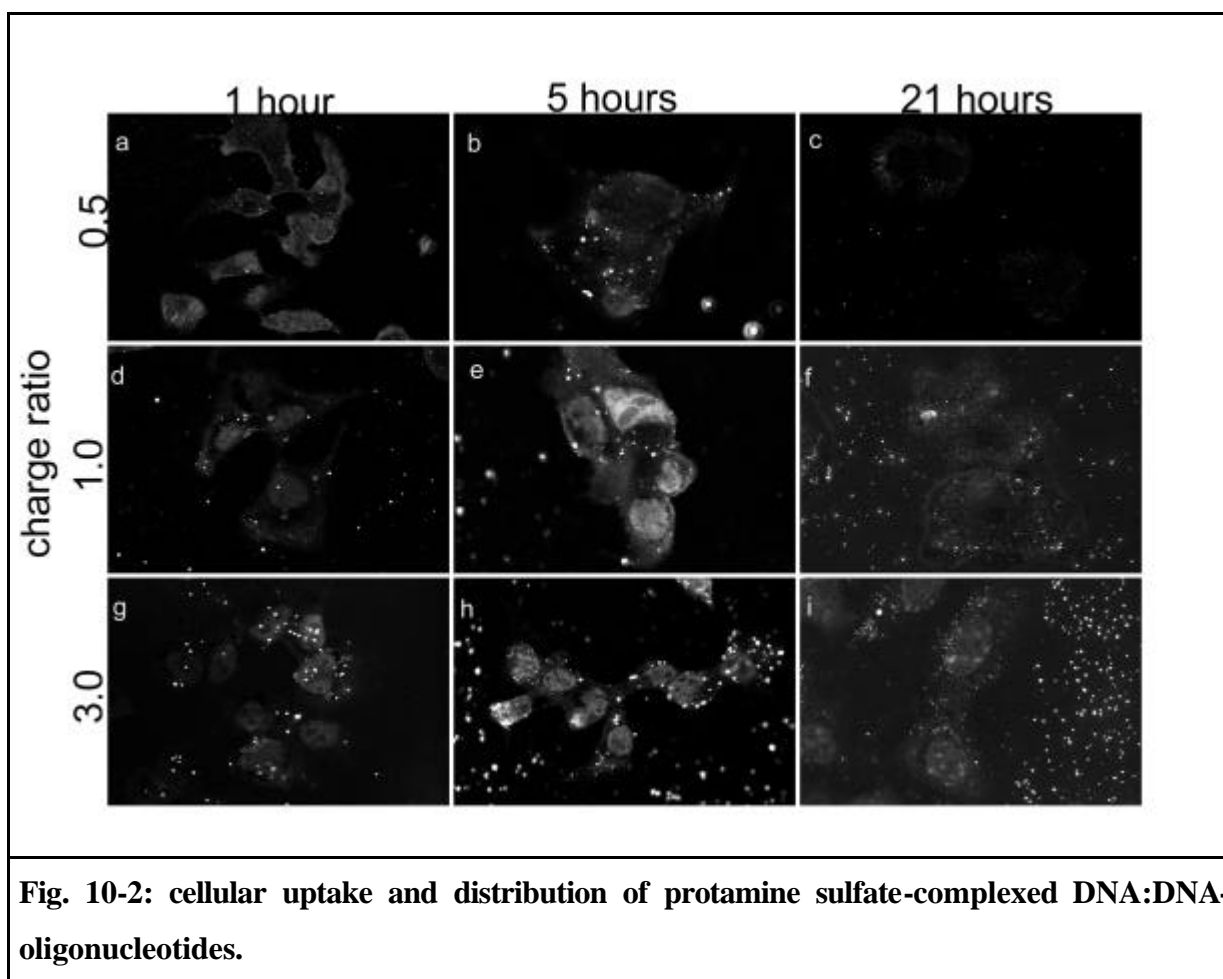


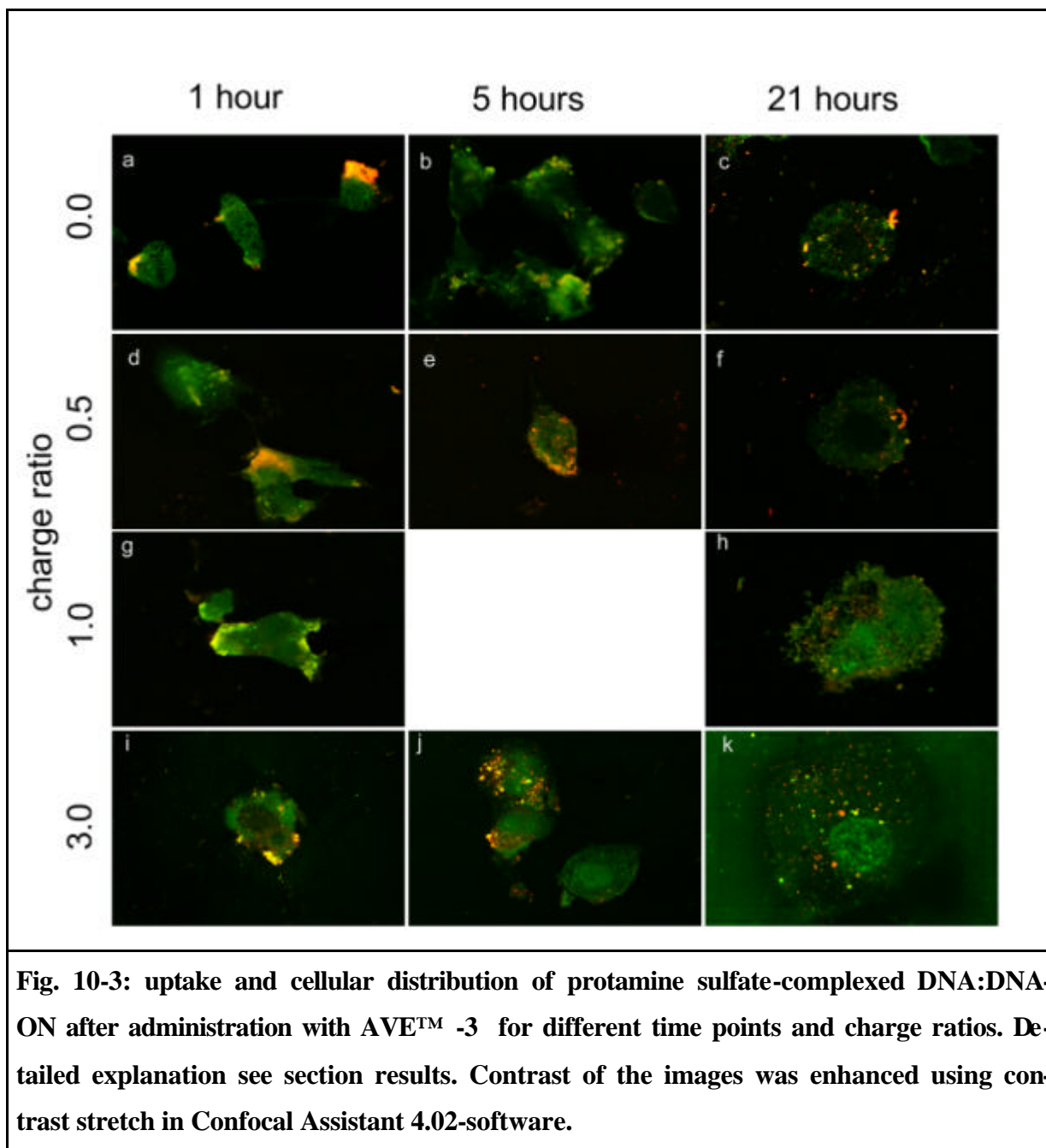
Fig. 10-1: Cellular uptake of fluorescence-labeled DNA:DNA-oligonucleotides without addition of liposomes and protamine sulfate after (a) 1 hour and (b) 21 hours of incubation. Contrast of the image was enhanced using contrast stretch in Confocal Assistant 4.02-software.

Uptake of the PS-ON complexes is a kinetically controlled process. After 1 hour only small amounts of fluorescence are observed in the nucleus. Negatively charged PS-ON complexes (at a PS:ON charge ratio of 0.5) show specific nuclear transport of genetic material (Fig. 10-2 a). Over time, fluorescence intensity diminishes (Fig. 10-2 b, c) indicating that protection from degradation by nucleases may be insufficient, due to the excess of negative charges of the complex. With increasing amounts of PS, nuclear transport of ON improved. Neutral complexes (Fig. 10-2 d-f) are able to transport ON to the nucleus with a relative maximum of fluorescence intensity seen after 5

hours of incubation. At a charge ratio of 3/1 (+/-) PS:ON, all visible nuclei appear highly fluorescent after 5 hr (Fig. 10-2 h). Fluorescence decreases after 21 hours, independent of the charge ratio of PS to ON (Fig. 10-2 f, i) indicating an yet undetermined metabolic or elimination processes.

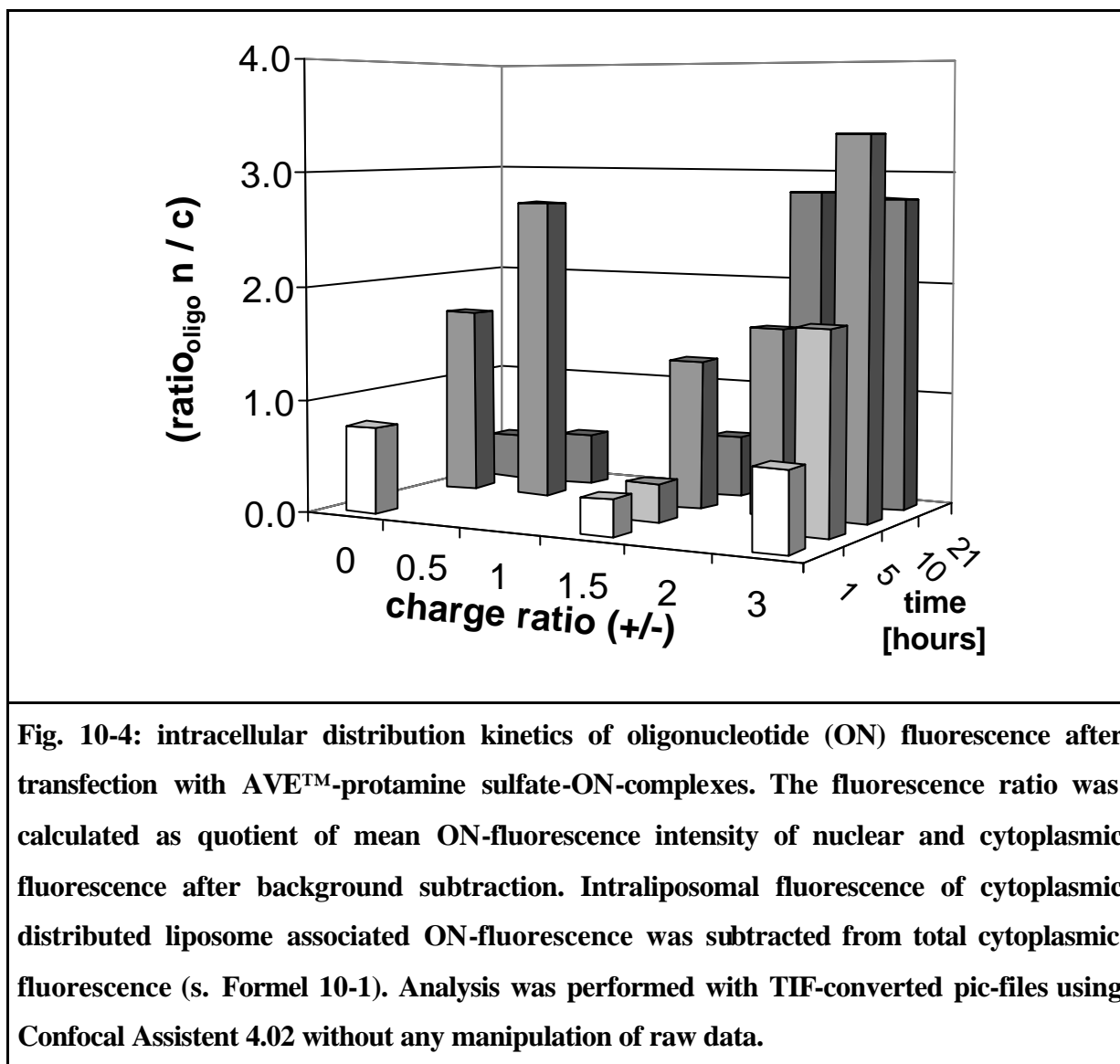


Uptake and cellular distribution of PS-condensed ON that are coated with artificial viral envelopes (AVETM-3) is shown in Fig. 10-3. At a charge ratio of 3:1 (+/-) nuclear uptake of ON increased with incubation times. After 1 h, nuclear fluorescence is relatively weak (Fig. 10-3 i), whereas after 5 and 21 hours incubation green fluorescence of ON accumulates selectively in the nucleus (Fig. 10-3 j and k). Lowering the PS:ON charge ratio to 1 (neutral complexes, Fig. 10-3 g and h) or to 0.5:1 (+/-) (Fig. 10-3 d-f) prior to coating with AVETM-3 is associated with decreased nuclear uptake which can be explained with an increase in nuclear elimination over time. Control experiments without PS present resulted in weak and transient nuclear fluorescence (Fig 10-3 a-c).



Fluorescence intensity of confocal images of PS-ON-AVE-complexes were quantified (Fig. 10-4). After a short-time incubation of 1 hour, a fluorescence ratio < 1 for all charge ratios investigated indicates a higher concentration of ON in the cytoplasm. Increasing the incubation time to 5 hours, the nuclear fluorescence increased and after 10 hours fluorescence ratios peaked in all, but one charge ratios (Fig. 10-4). Fluorescence ratio starts to decrease after 21 hours of incubation indicating nuclear elimination or degradation of fluorescent ON or fluorescence label. A maximum of fluorescence ratio is observed after 10 hours for a charge ratio of 3 (+/-) and after 21 hours of incubation with an excess of cationic charge.

With neutral liposomes instead of AVE™-3, there was no association of liposomes and oligonucleotides (data not shown).



$$ratio_{oligo} \frac{n}{c} = \frac{mFL_{oligo}(n) - mFL_{oligo}(b)}{\frac{A(c+l) * mFL_{oligo}(c+l) - A(l)mFL_{oligo}(l)}{A(c)} - mFL_{oligo}(b)}$$

$mFL_{oligo}(b, c+l, l, c, n)$ = mean ON fluorescence

$A(c+l, c)$ = integrated area

b = background

$c+l$ = cytosol + liposomes

l = liposomes

c = cytosol

n = nucleus

Formel 10-1: formula for calculation of fluorescence ratios

Discussion

A lack of sufficient cellular and nuclear uptake of naked ON has been reported by several investigators [167, 174]. The exact mechanisms of uptake is not clear, receptor-mediated uptake [175], non-receptor mediated uptake [176], or a pinocytotic mechanism [177] are being discussed.

Presumably due to their high negative charge, naked ON are poorly taken up by HepG2 cells. A weak cytoplasmic fluorescence after 1 hour is eliminated after 21 hours probably by enzymatic degradation of the ON and elimination of fluorescent label.

PS proves to effectively enhance the transport of ON into the nucleus of HepG2-cells. It is conceivable, that enzymatic degradation of ON as it traverses the cytoplasm to the nucleus might still be a problem which can arise from the biological instability of pure PS-DNA-complexes. A maximum of nuclear fluorescence was reached after 5 hours, and thereafter fluorescence in the nucleus starts to decrease. The ON is presumably degraded by intracellular nucleases and the fluorescent label is eliminated from the cell or inactivated by intracellular metabolic processes. With cationic charge in excess, ON are presumably protected from enzymatic degradation in the cytoplasm and therefore sufficient ON entered the nucleus. Long-term stability of ON within the nucleus increases the chance of interaction with genomic DNA. AVE™-3 associates with PS-condensed ON and ON itself. Successful transfection with AVE™ and PS-condensed plasmid was demonstrated in HepG2-cells in the presence of serum [97]. AVE™-3 has properties that enable passive nuclear targeting of ON. Using this liposomal formulation, ON could be delivered to the nucleus of cells. Cellular uptake of AVE™-3-coated PS:ON-complexes is a result of co-transport to the cytoplasm as indicated by the yellow colour which is a mixture of green ON-fluorescence and red AVE™-3-

fluorescence. After 1 hour, ON are not released from the complexes, whereas after 5 hours green ON-fluorescence and red AVETM-3-fluorescence are distinguishable. A maximum of nuclear fluorescence for the AVE:PS:ON complexes is observed after 10 hours for a 3:1 charge ratio (+/-). Decrease of nuclear fluorescence after 21 hours can be explained with enzymatic degradation of the unmodified ON or nuclear elimination of hydrolysed fluorescence label. Co-uptake of AVETM-3 and PS:ON-complex is important for successful development of modified AVETM-3 with targeting ligands to improve efficiency of the carrier system. PS-ON-complexes are released from the liposomal formulation, mainly by enzymatic degradation of the natural phospholipids of the liposomal formulation. Punctuate structures within the cytoplasm may be endosomes containing PS:ON:AVETM-3 or release products of the complex. A liposome formulation similar to the HIV-1-envelope has been shown to be localised close to the nucleus whereas control liposomes composed of phosphatidylcholine and cholesterol are localised in the vicinity of the cytoplasm membrane [178]. Localisation near the nucleus of cytoplasmic ON-containing vesicles was also observed, especially at an excess of cationic charge and long-time incubation of 21 hours. Furthermore, AVETM have fusogenic properties. For AVETM similar to HIV-1-envelope plain lipid envelope without CD4+-specific gp160 glycoprotein showed enhanced release of encapsulated FITC-dextran which is explained by its fusogenic properties due to the virus-like lipid composition [102].

As neutral liposomes can be taken up by the cells independently from PS:ON-complex, the co-uptake of AVETM-3 and PS:ON-complex is driven by charge attraction liposomes and cationic PS residues. PS serves as an electrostatic linker between both negatively charged counterparts.

The lipids of AVETM-3 are enzymatically degradable and fluorescence label may be metabolised or can be excreted from cells. However, it is rather likely that the lipids are not localised in the nucleus because nuclear localisation of red fluorescence label is very weak indicating that nuclear uptake of lipids is only taking place to a limited extend. A few observations of strong nuclear red-fluorescence (data not shown) correspond with observations by Godbey et al. who showed cytoplasmic uptake of PEI / plasmid-complexes after 2.5 hours and nuclear uptake of these complexes after 3.5 hours. A nuclear localisation of labelled cationic carrier system and labelled plasmid was evident [179]. The mechanism of these observations is still not clear. One may speculate that the nuclear membrane may be transiently disturbed due to interaction with this synthetic cationic carrier system.

Our results indicate an extranuclear metabolism of lipids. The theory of disruption of nuclear membrane by cationic protamine sulfate cannot be completely rejected up to now. However, administration of protamine to patients to counteract heparin effects, or as adjuvant to prolong insulin action in diabetic patients is not associated with toxic effects. The results of the kinetic analysis

can be used to optimise transfection protocols for HepG2 cells with oligonucleotides in cell culture. Cellular uptake with our carrier system is completed after 3 hours and ON are present in the nucleus after 5 hours, therefore washing steps should be performed after 3 - 5 hours to remove adsorbed complexes that may be harmful to cells in culture. 'Therapeutic efficiency' with respect to interaction with genomic DNA in the nucleus can be expected after 10 hours when the maximum of nuclear fluorescence is reached.

Materials and Methods

DNA-analogues of chimeric ON as the one used here (Abbildung 2-1) will be referred to as DNA:DNA-ON. A 5'-FAM (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) labeled 68-mer DNA:DNA-ON was synthesised and purified with a standard procedure (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Germany). ON content was determined spectrophotometrically using a BioPhotometer (Eppendorf-Hamburg, Germany) with a factor of 30 OD/ μ g ON. The 260/280 ratio was in the range of 1.8 to 2.0.

DOPS was obtained from Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA). Cholesterol was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). DLPE was obtained from Sygena (Liestal, Switzerland). LissamineTM-rhodamineB-1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (Rh-DOPE) was from Molecular Probes (Eugene, Oreg., USA). The formulation of AVETM-3 and protamine sulfate (Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA) were a gift of H. Schreier (H. Schreier Consulting, Sebastopol, CA, USA). EggPC was obtained from Lipoid (Ludwigshafen, Germany).

Preparation of liposomes

AVETM-3 is composed of equimolar amounts of DLPE, DOPS and Cholesterol. The lipids were dissolved in chloroform. The solvent was removed by rotary evaporation and the lipid film dried in vacuum for up to 1 hour until all traces of chloroform were removed. After rehydration in degassed 10 mM Tris pH 7.5, the multilamellar vesicles were agitated for 45 min. The multilamellar vesicles were reduced in size to 200 - 300 nm by gentle ultrasonic treatment using a Soniprep MSE 150 ultrasonic disintegrator with a titanium tip (N. Zivy & CIE SA, Oberwil-Basel, Switzerland) for preparation of AVETM-3. Tip-treated liposomes were centrifuged (5 min, 14000 rpm) in an Eppendorf table centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) to remove titanium shedding. Neutral liposomes composed of EggPC and Cholesterol (2/1 molar ratio) were prepared in a similar way. Liposomes were extruded through 50 nm diameter polycarbonate membranes using the LiposoFastTM extrusion device (Avestin, Ottawa, Canada). The size of the liposomes was determined at least after

two hours of extrusion with a Zetasizer 4 (Malvern Instruments, Herrenberg, Germany). In general, liposomes were in the range of 100 nm in diameter (mono-modal analysis).

ON and liposomes were appropriately diluted in 10 mM Tris pH 7.5 in such a way, that 20 μ l PS-solution was added to 80 μ l of DNA-solution, containing 5 μ g of DNA:DNA-ON. The complexes were incubated for 30 – 45 min. Appropriately diluted liposomes were added to the DNA-protamine sulfate (PS)-complexes to give a final volume of 200 μ l. After incubation for 15 min the final transfection system –composed of DNA:DNA-ON, PS and liposomes- was diluted to 1.5 ml with TN-buffer (10 mM Tris pH 7.5 / 140 mM NaCl) and transferred to HepG2 cells.

PS-ON-complexes and control experiments with naked ON were prepared in the same way.

Cell Culture and Transfection

HepG2 cells were cultured in 6well-plates. 10^5 cells per well were seeded 5-7 days before transfection and incubated at 37 °C and 5 % CO₂. Cells were grown in MEM-medium with Earle's salts (Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany), supplemented with 10 % FCS, glutamine and penicillin-streptomycin-solution (Sigma-Aldrich Co. LTD, Irvine, UK). Cells were washed with PBS immediately prior to the addition of 1.5 ml transfection system. If the incubation time was > 5 hours, cells were washed after 3 hours with PBS, and fresh serum-containing medium was added. Cells were incubated at 37 °C and 5 % CO₂. Post-incubation, cells were washed with PBS and transferred to coverslips on which 1 drop of mounting medium was placed. The mounting medium was composed of 22 % PVA, 11 % Glycerol, 56 mM Tris pH 7.5 and 5 % DABCO, which serves as anti-fading agent [124].

Confocal Laser Scanning Microscopy

A MRC-1000 confocal laser scanning imaging system (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK) with a Krypton/Argon laser was used. The system was equipped with a Nikon inverted microscope. A 60X oil-immersion objective was used. The system was controlled with Bio-Rad's COMOS-software. Images were converted to TIF-format with Confocal Assistant 4.02 software (Bio-Rad). Integration analysis of images was employed with Scion Image Release Beta 3b (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

Zellkulturversuche

11 Optimieren von Transfektionssystemen

11.1 Isolierung genomischer DNA nach Transfektion von HepG2-Zellen mit RNA:DNA-Hybridoligonukleotiden

in Zusammenarbeit mit S. Rühl, M. Metzler, U. Jacobs, R. Repp, W. Rascher, Klinik für Kinder und Jugendliche, Erlangen

Einleitung

Die Isolierung von genomischer DNA nach Transfektion der Zellen mit RNA:DNA-Hybridoligonukleotiden ist ein kritischer Schritt zum Nachweis der induzierten Punktmutation. Es ist nicht geklärt, ob und wie zum einen die Hybridoligonukleotide die Isolierung von DNA stören und zum anderen die kationischen Komplexe bzw. die kationischen Transfektionsreagentien die Isolierung der DNA beeinflussen können.

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgt über eine Anionenaustauschersäule. Die negativ geladene DNA wird an die positiv geladenen DEAE-Gruppen des Austauschermaterials gebunden. Genomische-, Plasmid- und Phagen-DNA wird durch eine 1,5 M Natriumchlorid-Lösung von der Säule eluiert. 30mer Oligonukleotide werden bereits durch eine 0,5 M Natriumchlorid-Lösung ausgewaschen [180].

Die Isolierung der DNA kann durch die Anwesenheit der kationischen kondensierenden Chemikalien, die an DEAE des Austauschermaterials binden als auch durch die Anwesenheit der 68mer Oligonukleotide, die mit der zu isolierenden DNA in Konkurrenz um die Bindungsplätze an dem Austauschermaterial treten können, gestört werden.

Ergebnisse

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers [128]. Der Gehalt des Isolats wird UV-spektrophotometrisch bestimmt.

Hybridoligonukleotide (Reihe 2 und 9) führen nicht zu einer negativen Beeinflussung der DNA-Isolierung. Sowohl die Ausbeute als auch die Qualität der isolierten DNA zeigen keinen Unterschied zum Isolat aus den mit T-Puffer (Reihe 1) behandelten Kontrollzellen. Erfolgt Kondensation mit PEI 25 kDa, ist sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von AVETM-3 keine genomische DNA isolierbar (Reihe 3, 5 und 8). Die DNA-Konzentrationen von 4 - 8 µg/ml sind von der Hintergrundintensität nicht zu unterscheiden. Die Extinktionen sind < 0,02. Die schlechte Qualität der DNA ist ebenfalls mit den extrem geringen Extinktionen und der damit verbundenen Streuung des Signals erklärbar. AVETM-3 haben keinen fördernden Einfluß auf die Qualität der DNA-Isolierung (Reihe 6).

Erfolgt die Kondensation mit Protaminsulfat (Reihe 4 und 7), ist kein signifikanter Unterschied im Gehalt und in der Qualität der isolierten genomischen DNA zu Puffer und Hybridoligonukleotid nachweisbar. AVETM-3 haben auch keine mengen- und qualitätsbeeinflussende Eigenschaft.

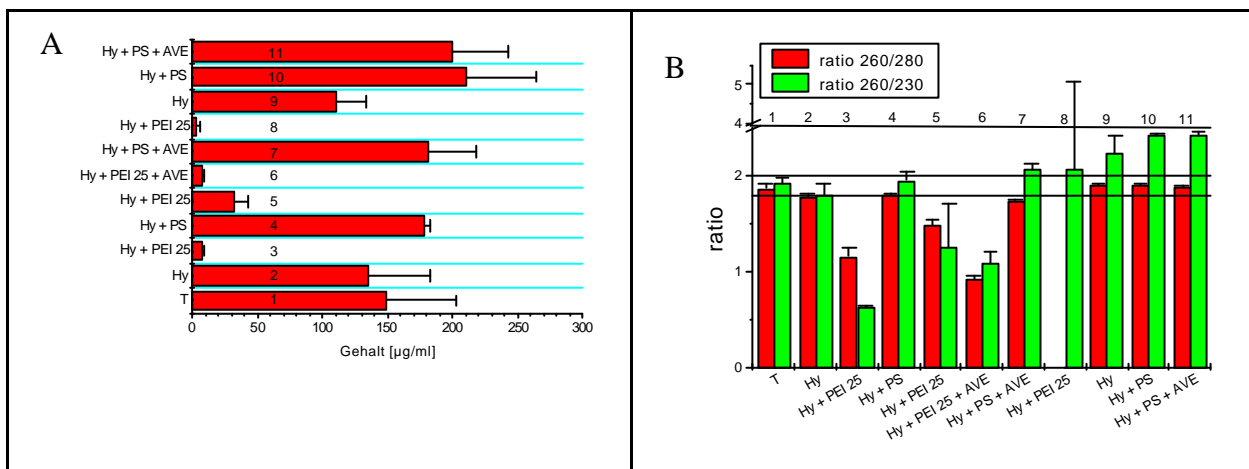


Abbildung 11-1: Isolierung von genomischer DNA nach Transfektion mit RNA:DNA-Hybridoligonucleotiden. A) Gehalt; B) Qualität, jeweils als MW + s.d.; T = T-Puffer; Hy = RNA:DNA(Ty); Hy + PEI 25 = RNA:DNA(Ty) + PEI 25 kDa 10:1 (+/-); Hy + PS = RNA:DNA(Ty) + Protaminsulfat 3:1 (+/-); AVE = AVETM-3 (artificial viral envelopes)

Diskussion

Die isolierte genomische DNA ist das Ausgangsmaterial für die folgenden Schritte der Restriktion und PCR-Amplifizierung zum Nachweis einer durch RNA:DNA-Hybridoligonukleotide induzierten Punktmutation. Daher ist das Isolieren der genomischen DNA in ausreichender Menge und Qualität eine wichtige Voraussetzung für den Nachweis der Mutation.

Nichtpeptidische kationische Polymere haben einen signifikanten Einfluß auf die DNA-Menge und Qualität. Mit PEI 25 kDa ist DNA im Isolat nicht nachweisbar. PEI wird durch die Aufreinigungsschritte nicht von der DNA getrennt. Das Polymer ist nach der Inkubation der Zellen noch intakt in der Zelle vorhanden. Durch die Lyse der Zellen wird die in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisierte NA und PEI freigesetzt. Es erfolgt Bindung der Nukleinsäure an PEI unter Neutralisierung der negativen Ladung, so dass keine Bindung der genomischen DNA an das Austauschermaterial der Säule erfolgen kann. Eine Zelle enthält 6 pg DNA, so dass in 10^5 - 10^6 Zellen 0,6 – 6 µg genomische DNA enthalten sind. Wird PEI mit 5 µg Hybridoligonukleotiden mit einem Ladungsverhältnis von 10:1 (+/-) angewendet, so ist PEI in einem solchen Überschuß vorhanden, dass die genomische DNA durch PEI gebunden wird und somit keine Affinität mehr zum Austauschermaterial der Säule hat.

Protaminsulfat ist ein kationisches Peptid. Daher erfolgt ein Abbau durch Peptidasen, die freie DNA wird an die Austauschersäule gebunden und kann anschließend isoliert werden.

AVETM-3 habe keinen Einfluß auf das Isolieren der DNA. Die negativ geladenen Liposomen sind auch nicht in der Lage, das Polymer zu neutralisieren, um DNA für die Bindung an das Austauschermaterial freizugeben.

Die Isolierung von DNA ist ein kritischer Schritt beim Nachweis einer durch Hybridoligonukleotide induzierten Punktmutation und kann den Nachweis einer Mutation durch Kreuzreaktionen mit kationischen Polymeren verhindern.

11.2 Zellproliferation

Einleitung

Die Messung der Zellproliferation liefert ein Maß für die Toxizität von applizierten Zubereitungen.

Der BrdU-Assay (Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Boehringer-Mannheim, Mannheim) ist ein ELISA. Die Zellen werden mit den Testsubstanzen versetzt und inkubiert. Anschließend wird BrdU zugesetzt und die Zellen werden inkubiert. Dabei wird BrdU an Stelle von Thymidin in die DNA eingebaut. Die DNA der Zellen wird nach der Inkubation mit BrdU denaturiert und der anti-BrdU-POD-Antikörper zugesetzt. Der Antikörper bindet an das inkorporierte BrdU in den neu synthetisierten Zellen. Nach intensivem Waschen der Zellen wird das chromogene Substrat zugesetzt. Das Enzym POD, welches an den Antikörper gebunden ist, katalysiert nun die Umsetzung des chromogenen Substrats. Die Enzymreaktion wird durch Zusatz von Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion mit einem ELISA-Reader gemessen.

Die Versuche werden in 96-well-Platten mit 10^4 Zellen / well durchgeführt.

Ergebnisse

Die beiden durchgeführten **Blindkontrollen** (1. Zellen + BrdU und 2. keine Zellen + BrdU

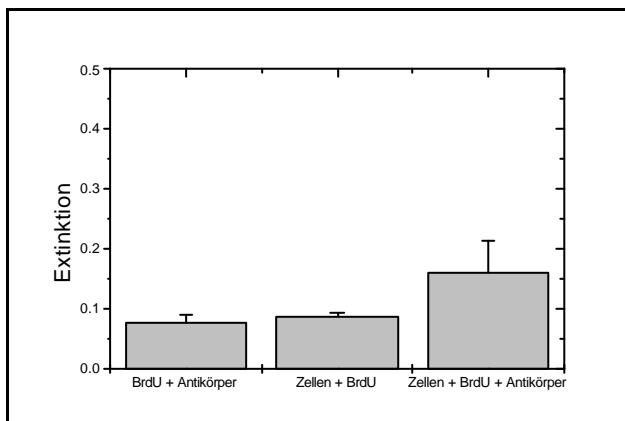


Abbildung 11-2: Extinktionen von Negativ- und Positivkontrollen beim BrdU-Assay

+ anti-BrdU-POD) zeigen keinen signifikanten Unterschied. Die Extinktion von BrdU + anti-BrdU-POD beträgt 0,076 ($n = 24$), bei Zusatz von BrdU zu Zellen $0,088 \pm 0,005$ ($n = 8$).

Bei der **Positivkontrolle** (Zellen + BrdU + anti-BrdU-POD ohne Zusatz von evtl. toxischen Substanzen) beträgt die Extinktion $0,161 \pm 0,052$ ($n = 7$) (Abbildung 11-2).

Die Toxizität von *DNA:DNA-Oligo* ist unabhängig von der zugesetzten DNA-Menge zwischen 5 und 5000 ng Oligonukleotid pro Näpfchen (Abbildung 11-3). Es ist kein signifikanter Toxizitätsunterschied zwischen den einzelnen Konzentrationen messbar.

<p>Abbildung 11-3: Toxizität von DNA:DNA-Oligonukleotiden</p>	<p>Abbildung 11-4 : Toxizität von AVE™-3</p>
<p>Abbildung 11-3-9: Die Linie ($E = 0,08$) signalisiert die Hintergrundextinktion der Blindversuche. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von Vierfachbestimmungen. Ist MW – s.d.größer wie der Hintergrund und unterschreitet dieser Wert nicht das Hintergrundsignal, so ist die Formulierung nicht toxisch. Unterschreitet MW – s.d. den Schwellenwert, kann keine Aussage über die Toxizität gemacht werden. Ist der MW der Extinktionen so groß wie das Hintergrundsignal, so ist die Formulierung toxisch.</p>	

Die liposomale Formulierung AVE™-3 ist ebenfalls im untersuchten Konzentrationsbereich nicht toxisch. Bei 15000 µg Liposomen / Nöpfchen ist der MW – s.d. kleiner wie der Blindwert, so dass hier evtl. ein toxischem Einfluß der Liposomen möglich sein kann (Abbildung 11-4). Die zunehmende Extinktion bis 1500 ng/Nöpfchen ist nicht signifikant. Eine Zunahme der Zellviabilität kann durch einen stoffwechsel- und damit proliferationsfördernden Effekt der Lipide erklärt werden. Lipide sind in Zellkulturmedien nicht vorhanden.

Die kationischen Verbindungen zeigen unterschiedliche Toxizitäten in Abhängigkeit von

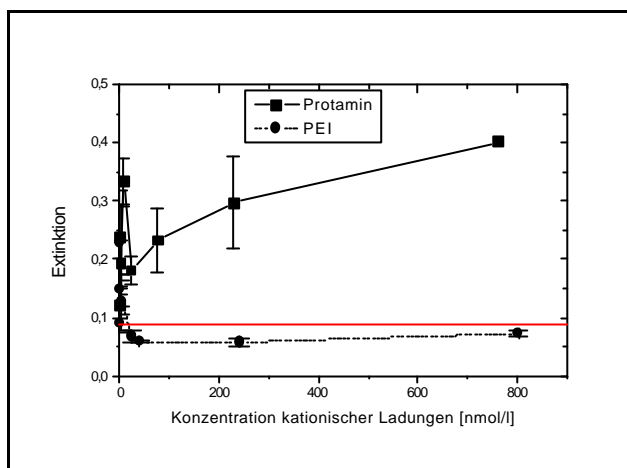


Abbildung 11-5: Toxizität von kationischen Polymeren zur DNA-Kondensation

Konzentration und Art des Polymers. Protamin ist bis zu einer Konzentrationen von 800 nmol/l un-
toxisch. PEI ist bereits in Konzentrationen von 50
nmol/l toxisch (Abbildung 11-5).

Die Toxizität von *DNA-Protaminsulfat-Komplexen* ist von der DNA-Menge und Konzen-
tration des kondensierenden Kations abhängig. Bei einer DNA-Menge von 5 ng und 50 ng ist
keine Toxizität nachweisbar. Die Extinktion ist
unabhängig vom Ladungsverhältnis Protamin /
DNA konstant. Wird die DNA-Menge auf 500 ng

erhöht, so sind die Komplexe bis zu einem Ladungsverhältnis von 3 schwach toxisch, bei einem
Ladungsverhältnis von 10 dann toxisch. Werden die Komplexierungen mit 5000 ng DNA durchge-
führt, so zeigen alle DNA-Protamin-Konstrukte toxische Effekte (Abbildung 11-6).

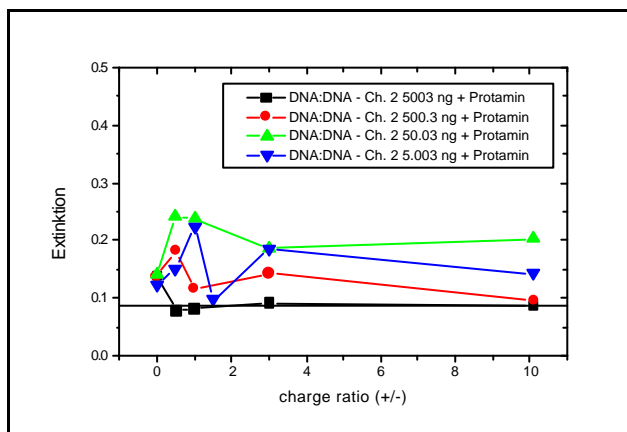


Abbildung 11-6: Toxizität von DNA:DNA-Oligonukleotid - Protamin - Komplexen

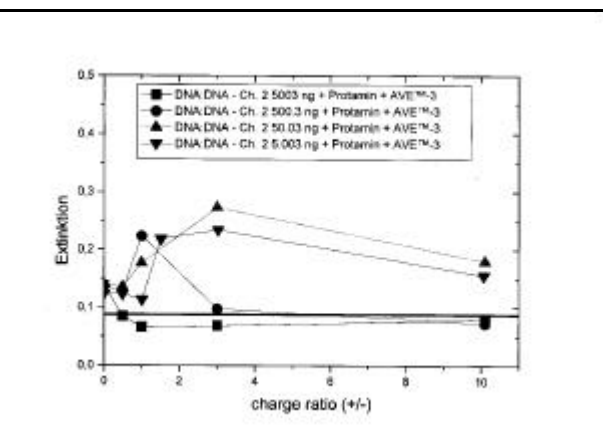


Abbildung 11-7: Toxizität von DNA:DNA-Oligonukleotid - Protamin - AVE™-3 - Konstrukten

Abbildung 11-6 - 11-9: Die Bestimmung sind im Regelfall als Vierfachbestimmungen durchgeführt worden. Zur Erhöhung der Übersichtlichkeit sind die Fehlerbalken nicht dargestellt.

Bei *DNA-Protaminsulfat-AVE™-3* ist der Verlauf der Toxizitätskurven ähnlich. Die Kon-
strukte mit 5 ng und 50 ng DNA sind bei allen untersuchten Ladungsverhältnissen un-
toxisch. Bei Erhöhung der DNA-Menge auf 500 ng zeigen sich ab einem Ladungsverhältnis von 3 toxische Ef-

fekte, im Falle von 5000 ng bereits bei geringeren Mengen Protaminsulfat. AVETM-3 hat einen schwachen toxizitätsvermindernden Effekt (Abbildung 11-7).

PEI-DNA-Komplexe sind toxischer wie Protamin-DNA-Komplexe. Unabhängig vom Ladungsverhältnis sind Komplexe bei einer DNA-Menge von 500 ng und 5000 ng toxisch. Bei einer DNA-Menge von 5 ng ist keine Toxizität nachweisbar, während bei 50 ng DNA die Toxizität mit zunehmender PEI-Menge linear zunimmt, so dass die Komplexe mit einem Ladungsverhältnis von 10 (+/-) toxisch sind (Abbildung 11-8).

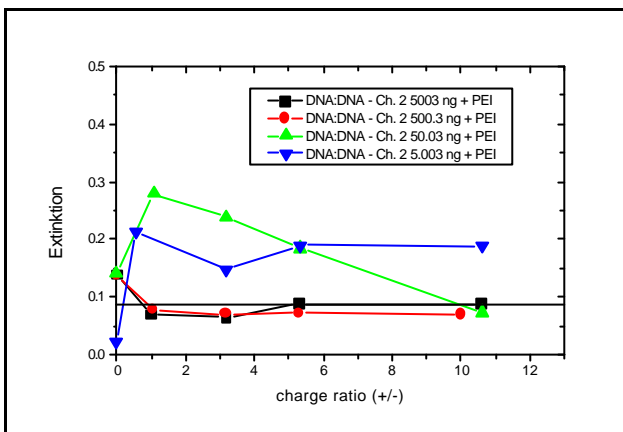


Abbildung 11-8: Toxizität von DNA:DNA-Oligonukleotid - PEI - Komplexen

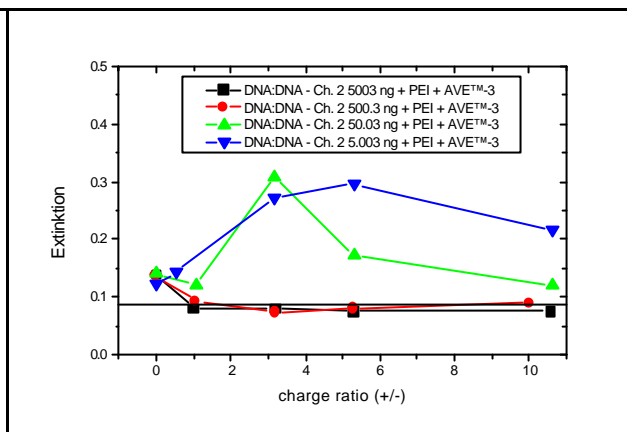


Abbildung 11-9: Toxizität von DNA:DNA-Oligonukleotide - PEI - AVETM-3 - Konstrukten

PEI-DNA-AVETM-3 – Konstrukte sind bei einer DNA-Menge von 500 ng bzw. 5000 ng toxisch. Während bei 50 ng DNA wieder eine konzentrationsabhängige Toxizitätszunahme von PEI-DNA-AVETM-3-Konstrukten nachweisbar ist, ist bei einer DNA-Menge von 5 ng keine Toxizität nachweisbar. Stattdessen ist ein Anstieg der Extinktion messbar, der anzeigt, dass die Viabilität der Zellen in Gegenwart von AVETM-3 zunimmt (Abbildung 11-9).

Diskussion

Das DNA:DNA-Oligonukleotid ist in allen untersuchten Konzentrationsbereichen untoxisch. Da das nackte Oligonukleotid die Zellmembran nicht durchdringen kann, erfolgt keine Aufnahme in die Zelle und es ist daher kein toxischer Effekt nachweisbar.

Die AVETM-3-Liposomen, die auch in der Abwesenheit von kationisierten DNA-Komplexen in der Lage sind, Zellmembranen zu überwinden (Daten nicht gezeigt), zeigen in den Konzentrationsbereichen, die für Zellkulturversuche wichtig sind, keine Toxizität. Aufgrund der Zusammensetzung der Liposomen aus Lipiden, die auch Bestandteil natürlicher Zellmembranen sind, ist bei Zugabe der Liposomen eine leichte Erhöhung der Zellproliferation durch einen nutritiven Effekt

nachweisbar. Die Supplementierung mit Lipiden führt zu einer Erhöhung der Stoffwechselaktivität der Zelle.

Wird das DNA:DNA-Oligonukleotid mit kationischen Verbindungen komplexiert, so führt eine DNA-Menge von 5000 ng / Nöpfchen in allen Proben (PEI / PS mit und ohne AVE™-3) zu einer signifikanten Toxizität. Eine DNA-Menge von 500 ng / Nöpfchen, die in Bezug auf die Konzentrationen den Bedingungen bei der Transfektion mit Hybridoligonukleotiden in 6-well-Platten entspricht, ist bei einem hohen Überschuß kationischer Ladung toxisch. Eine Reduzierung der DNA-Menge erscheint daher sinnvoll und muß in weiteren Toxizitätsassays optimiert werden. Desweiteren erscheint es sinnvoll, zu jedem Transfektionsexperiment auch die entsprechende Toxizitätsstudie durchzuführen, weil der Konzentrationsbereich, in dem die Komplexe mit den unterschiedlichen Trägersystemen toxisch sind, mit den bei den Transfektionsversuchen gewählten Bedingungen ähnlich ist. Eine Reduzierung der Hybridoligonukleotidmenge kann die Konversionsrate erhöhen, weil die Zellen weniger toxisch geschädigt werden. Das Messen der Zellproliferation ist gleichzeitig ein Marker für die Stoffwechselaktivität der Zelle. Es ist zu vermuten, dass eine hohe Zellproliferation auch mit einer hohen Reparaturrate einhergehen kann, weil in proliferierenden Zellen DNA-Synthese und damit auch Reparatur wahrscheinlicher stattfinden.

Die Toxizität von PEI-komplexierten DNA:DNA-ON ist höher als die Toxizität von PS-komplexierten DNA:DNA-ON. PS ist als Peptid aus Aminosäuren aufgebaut. In der Zelle existieren über Peptidasen Abbaumechanismen für die kationische Verbindung. Ursache für die größere PEI-Toxizität kann die bisher nicht geklärte Bioabbaubarkeit von PEI sein, die über Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Zellmembran zu Permeabilitätsstörungen führt, die für die toxische Schädigung verantwortlich sein kann. Weiterhin kann die Toxizität auch durch den endosomolytischen Effekt von PEI verursacht sein, der zu einer Freisetzung toxischen Endosomeninhalts in das Zytoplasma führen kann. Protaminsulfat ist eine natürliche Verbindung, die in Zellen vorkommt und somit natürlicherweise keine toxischen Wirkungen auf die Zelle ausübt.

Zusammenfassung

Die Wechselwirkung von Genträgersystemen mit Säulenmaterial zur Aufreinigung von Nukleinsäuren bei der Isolierung genomischer DNA ist ein kritischer Parameter, der den Nachweis einer erfolgreichen Transfektion verhindern kann. PEI 25 kDa verhindert die Isolierung von genomischer DNA, während nach Applikation von protaminsulfatkondensierten Hybridoligonukleotiden kein signifikanter Einfluss auf die Menge und Qualität der isolierten DNA gemessen werden konnte. Umhüllen der komplexierten DNA mit AVETM-3 hat keinen Einfluss auf die Menge und Qualität der isolierten DNA.

Weiterhin kann durch die Toxizität von Genträgersystemen eine Konversion von Punktmutationen durch Hybridoligonukleotide verhindert werden. Die Untersuchungen zeigen, dass in dem Konzentrationsbereich, in dem Transfektionen mit PEI 25 kDa-kondensierten Hybridoligonukleotiden durchgeführt worden sind, die applizierten Komplexe toxisch sind. Minimieren der Nukleinsäuremenge führt zu untoxischen Gentransfersystemen. Protaminsulfat-Nukleinsäure-Komplexe sind bei einer Nukleinsäuremenge, die in Transfektionsexperimenten eingesetzt werden, nicht oder nur teilweise toxisch. AVETM-3-Umhüllung der Komplexe reduziert die Toxizität durch einen nutritiven Effekt, weil den Zellen Lipide, die Bestandteil ihrer Zellmembran sind, zugeführt werden.

12 Zusammenfassung und Ausblick

Pharmazeutisch-technologische Maßnahmen und biophysikalische Untersuchungen zur Charakterisierung von Genträgersystemen sind notwendig, um Genträgersysteme herzustellen und zu optimieren.

Die gewonnenen Kenngrößen für die Optimierung eines Gentransfersystems zur Transfektion von Leberzellen mit RNA:DNA-Hybridoligonukleotiden (Chimeraplasts) und deren DNA-Analoga angewendet worden.

Hybridoligonukleotide sind ein vielversprechendes System zur Kausaltherapie von monogenetischen Erkrankungen durch die Genkonversion einer Einzelbasenmutation. Für die erfolgreiche Genkonversion und deren Nachweis sind folgende Schritte notwendig:

- a) Assoziierung der Nukleinsäure mit einem kationischen Kondensationsreagenz
- b) Transfektion der Zelle mit Transport der Nukleinsäure in den Zellkern
- c) Genkonversion durch zelleigene Reparaturenzyme und Nachweis der Konversion der defekten Base im Genom der Zelle durch Restriktion, Sequenzierung und Fragmentanalyse.

Mit einem optimierten Gentransfersystem aus

- Protaminsulfat : Oligonukleotid 3:1 (+/-) Ladungsverhältnis in Tris 10 mM pH 7,5 und
- Umhüllung des Komplexes mit AVETM-3 (artificial viral envelope), einer negativ geladenen liposomalen Formulierung, deren Zusammensetzung von der Zusammensetzung viraler Hüllen abgeleitet ist, in Tris 10 mM pH 7,5 und anschließend
- Isotonisieren mit Tris/Natriumchlorid-Puffer

erfolgt ein hocheffizienter Transport der Nukleinsäuren in den Zellkern, so dass aus pharmazeutisch-technologischer Sicht alle Anforderungen (Schritt a und b) für eine erfolgreiche Konversion erfüllt sind. Die Aufnahme in die Zellen ist nach 3 – 5 Stunden abgeschlossen. Ein Nachweis der Genkonversion konnte aufgrund der bisher vorhandenen Analysentechnik nicht zweifelsfrei geführt werden.

Für diese Arbeiten wurden verschiedene Techniken eingesetzt:

1. **Konfokale Laserscanningmikroskopie** zeigt den erfolgreichen Transport eines fluoreszenzmarkiertes DNA-Analogon der Hybridoligonukleotide in den Nucleus sowie den Kotransport von komplexierter DNA mit AVETM-3 in HepG2-Zellen, einer humanen Hepatomazelllinie.
 - a. Es konnte gezeigt werden, dass bei einem Ladungsverhältnis von 3:1 (+/-) von Protaminsulfat zum Oligonukleotid ein Transport des DNA-analogen Hybridoligonukleotids in den Zellkern erfolgt. Dieser Kerntransport konnte sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von AVETM-3 gezeigt werden.
 - i. Weitere mikroskopische Untersuchungen werden zeigen, ob auch andere kationische nukleinsäurekondensierende Verbindungen mit und ohne AVETM einen Zellkerntransport von fluoreszierenden DNA-Analoga und fluoreszenzmarkierten RNA:DNA-Hybridoligonukleotiden vermitteln können.
 - ii. Weiterhin muss noch untersucht werden, inwieweit die DNA-Analoga eine ähnliche intrazelluläre Prozessierung wie die Hybridoligonukleotide erfahren. Hier könnte es sein, dass die O-methylierten RNA-Anteile in den Hybridoligonukleotiden durch veränderte Affinitäten zu DNA- und RNA-abbauenden Enzymen zu einer veränderten Prozessierung führen. Allerdings ist zu erwarten, dass das Hybridoligonukleotid in der Zelle stabiler ist als das DNA-Analogon, welches über einen Zeitraum von 21 Stunden im Nucleus nachgewiesen werden konnte.
 - b. AVETM-3 unterstützen die Aufnahme von protaminkomplexierten Nukleinsäuren in den Zellkern. Die negativ geladenen Lipide umhüllen den kationischen DNA-Nukleinsäure-Komplex. Weitere Versuche sollen zeigen, dass durch Einlagerung von Targetingsequenzen an die Liposomen, z. B. von fettsäuregekoppelten Proteinen oder Einbau eines lactosemodifizierten Lipids, ein Targeting der Hepatozyten erzielt werden kann. Targeting mit AVETM hat den Vorteil, dass die Liganden nicht direkt mit der komplexierenden kationischen Verbindung assoziiert sind, sondern mit dem Trägersystem für den DNA-Komplex. Strukturveränderungen des komplexierenden Kations durch die DNA haben somit keinen Einfluß auf die Präsentation der Targetor auf der Oberfläche des Genträgersystems. Mit konfokaler Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass ein gemeinsamer Transport von Liposomen und (komplexierter) Nukleinsäure erfolgt.
 - c. Die Mutation konnte bisher noch nicht erfolgreich nachgewiesen werden. Ein Wechsel der Zelllinie scheint eine Lösung der nichtnachweisbaren Mutation zu sein.

HepG2-Zellen konnten bisher nur eine Konversion von 2-3 % zeigen (R. Blaese, Kimeragen Inc., mündliche Mitteilung). Das ist eine Konversionsrate, die sich an der unteren Nachweisgrenze befindet, so dass eine evtl. erfolgreiche Konversion analytisch nicht zugänglich war. Eine Änderung der Zelllinie zu HuH-7-Zellen, für die Genkonversion in hohem Ausmaß gezeigt werden konnte [45, 106], ist eine Möglichkeit, eine erfolgreiche Genkonversion zu erzielen. Weitere Versuche sollen mit HuH-7-Zellen durchgeführt werden. Das Nachweissystem wird weiter optimiert, um auch Mutationsraten $< 2\%$ signifikant nachweisen zu können. Es ist bisher noch nicht klar, welche Parameter dafür verantwortlich sind, dass eine Genkonversion stattfindet. Zellteilung ist aber für eine Genkonversion nicht notwendig [181]. Weitere Untersuchungen werden die Parameter, die für eine erfolgreiche Konversion notwendig sind, aufzeigen. Durch Induktion einer Punktmutation, bei der ein direkt nachweisbares Genprodukt (z. B. Mutation einer nichtfluoreszierenden GFP-Variante zu einem fluoreszierenden Derivat) entsteht, kann ohne ein zeitaufwendiges PCR-, Digestions- und Sequenzierungsverfahren fluoreszenzmikroskopisch eine erfolgreiche Mutation nachgewiesen werden. Dazu muss eine rekombinante Zelllinie mit insertiertem mutiertem Markergen etabliert werden, bei der Erfolg und Misserfolg der Genkonversion direkt nachweisbar sind.

2. Ein sehr wichtiger Einflußfaktor, der die Effizienz von Genträgersystemen bestimmt, ist das Ladungsverhältnis der kationischen Verbindung zu den negativ geladenen Nukleinsäuren. Untersuchungen zur **Analytik von Nukleinsäuren** zeigen die Notwendigkeit, den Gehalt und die Qualität von kommerziell erhältlichen Nukleinsäurechargen zu überprüfen. Transport und Lagerung können z. B. zu vermindertem DNA-Gehalt führen. Die UV-Photometrie ist die geeignete Methode zur Bestimmung von DNA-Gehalt und Qualität, wenn eine gepulste Xenon-Lampe mit einer stabilen Emission von UV-Licht verwendet wird. Klassische UV-Photometer mit Quecksilberdampflampen können wegen der Instabilität der gemessenen Extinktion nur unter Verwendung von Standardnukleinsäuren für die Gehaltsbestimmung verwendet werden, wobei die Stabilität des Standards nur durch UV-Photometrie bestimmt werden kann. Fluorimetrie ist ebenfalls auf die Verwendung eines Standards angewiesen und ist für die Routineanalytik aufgrund der langen Versuchsdauer (Herstellung einer Eichgeraden) wenig zur DNA-Gehaltsbestimmung geeignet.

Eine Überprüfung der Qualität und des Gehalts von Oligonukleotiden unter GMP-Bedingungen ist für die Reproduktion von Experimenten mit verschiedenen Chargen von Oligonukleotiden notwendig. Weitere systematische Untersuchungen mit verschiedenen Chargen

müssen zeigen, ob DNA-Analoga der Hybridoligonukleotide reproduzierbar kondensier- und transfizierbar sind. Eine systematische Untersuchung dieser Problematik war im Rahmen der Arbeiten nicht durchführbar, ist aber für eine GMP-konforme Etablierung des Transfektionssystems unbedingt notwendig.

3. Die **Isolierung von Nukleinsäuren** ist heute eine Routinemethode. Mit kommerziellen Isolierungskits kann innerhalb kurzer Zeit DNA in bester Qualität dargestellt werden. Durch Mehrfachnutzung der Säulen ist unter Einsatz eines minimalen Mehraufwands an Zeit eine große Kostenersparnis möglich. Allerdings muß noch überprüft werden, ob bei der Mehrfachisolierung alle geforderten Reinheitskriterien erfüllt sind. Insbesondere kann sich das Problem der Verunreinigung der Präparate mit Endotoxinen ergeben, die den Transfektionserfolg negativ beeinflussen würden. Weiterhin wurde gezeigt, dass das Isolieren von genomischer Nukleinsäure nach dem Transfizieren durch die Anwesenheit von kationischen Verbindungen, die in Wechselwirkung mit dem kationischen Trägermaterial der Ionenaustauschersäule treten, gestört werden kann. Insbesondere das Polymer PEI 25 kDa führt zu einer massiven Verringerung der DNA-Ausbeute. Protaminsulfat als natürliche kationische Verbindung wird während der Proteinasebehandlung verdaut, so dass die freie genomische Nukleinsäure mit der Säule in Wechselwirkung treten kann.
4. Die **Größencharakterisierung von Liposomen** zeigt den Einfluß des Puffermediums auf die Stabilität von Liposomen in Abhängigkeit vom umgebenden Milieu. Die negativ geladenen AVETM-3 sind nach Herstellung in T-Puffer stabil und können sogar einem isotonischen Tris/Natriumchlorid-Puffer ausgesetzt werden, ohne dass sich die Größe ändert. DOTAP-Liposomen quellen in Phosphat-Puffer auf, während in Tris-Puffer die Größe der Liposomen stabil ist. Systematische Untersuchungen des Quellungsverhaltens von (kationischen) Liposomen und komplexierten Nukleinsäuren müssen durchgeführt werden, um die Stabilität der Gentransfersysteme z.B. in Zellkulturmedien unterschiedlichster Zusammensetzung vorhersagen zu können.
5. Durch **Transmissionselektronenmikroskopie** konnte gezeigt werden, dass AVETM-Liposomen protaminkondensierte Plasmide umhüllen. In Kombination mit der Rasterkraftmikroskopie ist eine Aufklärung der vorhandenen Strukturen in dem ternären Gemisch aus Nukleinsäure, Protamin und Liposomen möglich. Durch TEM sind Liposomen und DNA-Komplexe darstellbar, **Rasterkraftmikroskopie** dient der Abbildung von freien Nukleinsäuren und komplexierten Nukleinsäuren, Liposomen sind mit dieser Technik nicht darstellbar.
6. Weitere **rasterkraftmikroskopische Untersuchungen** zur Strukturaufklärung von Plasmid-DNA-Komplexen mit Protaminsulfat und kationischen Formulierungen von Trimethyl-

ammoniumpropan-Derivaten -mit dem bekanntesten Vertreter DOTAP- zeigen, dass unter bestimmten Voraussetzungen kolloidale, kugelförmige Strukturen erhalten werden. Protamin-DNA-Komplexe zeigen bei hohem Ladungsüberschuß kompakte kugelförmige Strukturen, während die Komplexe der kationischen Lipide mit DNA heterogenere Strukturen von nervenzell-ähnlicher Morphologie bis zu kolloidalen kugelförmigen Partikeln zeigen. Deshalb ist es notwendig, die verschiedenen morphologisch geformten Strukturen aufzutrennen, nach erfolgreicher Auftrennung mit AFM zu untersuchen, um dann in Transfektionsexperimenten die Transfektionseffizienz der einzelnen Komponenten zu bestimmen. Die Field-Flow-Elektrophorese bietet die Möglichkeit, kolloidale Systeme in ihrem Lösungsmedium aufzutrennen. Die erhaltenen Fraktionen können dann mit AFM charakterisiert werden. Transfektionsversuche können zeigen, ob einzelne Fraktionen erhöhte Transfektionseffizienzen aufweisen oder ob ein Gemisch verschiedener Fraktionen zu einem erhöhten Transfektionserfolg führen kann.

Die AFM-Technik bietet insbesondere im Vergleich zu TEM die Möglichkeit der Darstellung von freier Nukleinsäure im untersuchten Präparat. Mögliche Präparationsartefakte durch Messung der auf Glimmer getrockneten Präparate in Luft müssen durch Vergleich weiterer Präparationsmethoden, insbesondere Messung in der Lösungsmittelzelle oder die Auswahl eines anderen Untergrundes zum Abbilden, z. B. Silicium, erzielt werden.

Eine Bindung von DNA oder komplexierter DNA an den kationisierten Glimmer ist bisher in der Lösungsmittelzelle nicht möglich. Weitere Untersuchungen unter Variation von Art des kationischen TAP-Derivats und der Konzentration des Helferlipids Cholesterol müssen durchgeführt werden, um eine optimale Liposomenzusammensetzung zu finden, die zum einen auf Glimmer spreitet, bei der Abbildung im TappingMode™ in Lösung stabil ist und zu der mit kationischen Lipiden komplexierte DNA eine Affinität besitzt. Vorteil der Abbildung auf kationisiertem Glimmer ist, dass die starken Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen Substrat für die Mikroskopie mit den kationischen Komplexen durch schwächere hydrophobe Wechselwirkungen der lipidbeschichteten DNA-Komplexe mit dem hydrophoberen Untergrund ersetzt werden können.

7. Es sind zwei **fluorimetrische Nachweismethoden (Assays)** zur Messung der Kondensation von Nukleinsäuren entwickelt worden. Die beiden Fluoreszenzassays sind so entwickelt worden, dass mit minimalem Substanzbedarf (200 ng Nukleinsäure / Messung) die Kondensation gemessen werden kann. Es kann auch die Kondensation unter exakt den Bedingungen der Komplexbildung für Zellkulturversuche oder Tierexperimente durchgeführt werden. Kondensationsmessungen in 4 ml Makroküvetten können nicht die Kondensation unter Bedingungen der Zellkultur simulieren, weil die DNA-Mengen im Vergleich zu üblichen Volumina von 100 – 200 µl für die

Kondensation um einen Faktor 20 bis 40 erhöht werden müssen. PCS-Größenmessungen haben gezeigt, dass die Größe von Komplexen entscheidend von Masse der Nukleinsäure und dem Volumen, in welchem kondensiert wird, beeinflusst wird. Erhöhte DNA-Mengen können zu starken Änderungen der Größe von Nukleinsäuren innerhalb von wenigen Minuten führen. Es kommt zu Ausflockungen und Sedimentationen, also ein System, welches für das Simulieren der *in-vitro*- oder *in-vivo*-Applikation nicht mehr geeignet ist. Deshalb müssen biophysikalische Untersuchungen mit Assays durchgeführt werden, mit denen das experimentelle Versuchsdesign für die Zellkultur bzw. Tierversuch exakt übernommen werden kann.

- a. Der **Kinetikassay** ermöglicht neben der Messung der Kondensation auch, die Stabilität von Nukleinsäurekomplexen zu untersuchen. Mit dem Kinetikassay können Reifungsvorgänge der komplexierten Nukleinsäuren nachgewiesen werden, die zu Strukturveränderungen der Komplexe führen können, die die Transfektionseffizienz modulieren können.
 - i. **Ethidumbromid**, der am häufigsten verwendete Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von Nukleinsäuren, besitzt eine Eigenfluoreszenz. Eine mögliche Penetration in Liposomen führt zur möglichen Ausbildung von fluoreszierenden Liposomen-EB-Addukten, deren Fluoreszenzcharakteristik nicht aufgeklärt ist. Konzentrationsabhängig kann sich der lipophile Farbstoff mit Phenanthridinstruktur in den Lipidbilayer einlagern. Durch eine parallele Anordnung der Farbstoffmoleküle im Lipidbilayer ist eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität durch Wechselwirkung mit dem kationischen Bilayer möglich. Weiterhin ist EB ebenfalls eine nukleinsäurekondensierende Verbindung, die aufgrund der geringen Spezifität zu Nukleinsäuren in hohen Konzentrationen angewendet werden muß, um ein starkes Fluoreszenzsignal zu erhalten, was dann wiederum zu einer Veränderung der DNA-Struktur durch Entwindung der überdrillten Struktur führen kann. Die Folge ist eine Beeinflussung der Wechselwirkung der nicht mehr in der nativen Struktur vorliegenden Nukleinsäure mit dem kationischen Transfektionssystem. Die Änderung des Hintergrundsignals durch Veränderung der freien Farbstoffkonzentration durch Penetration des Fluoreszenzfarbstoffs in Liposomen sowie die DNA erschwert die mathematische Auswertung um ein Vielfaches.

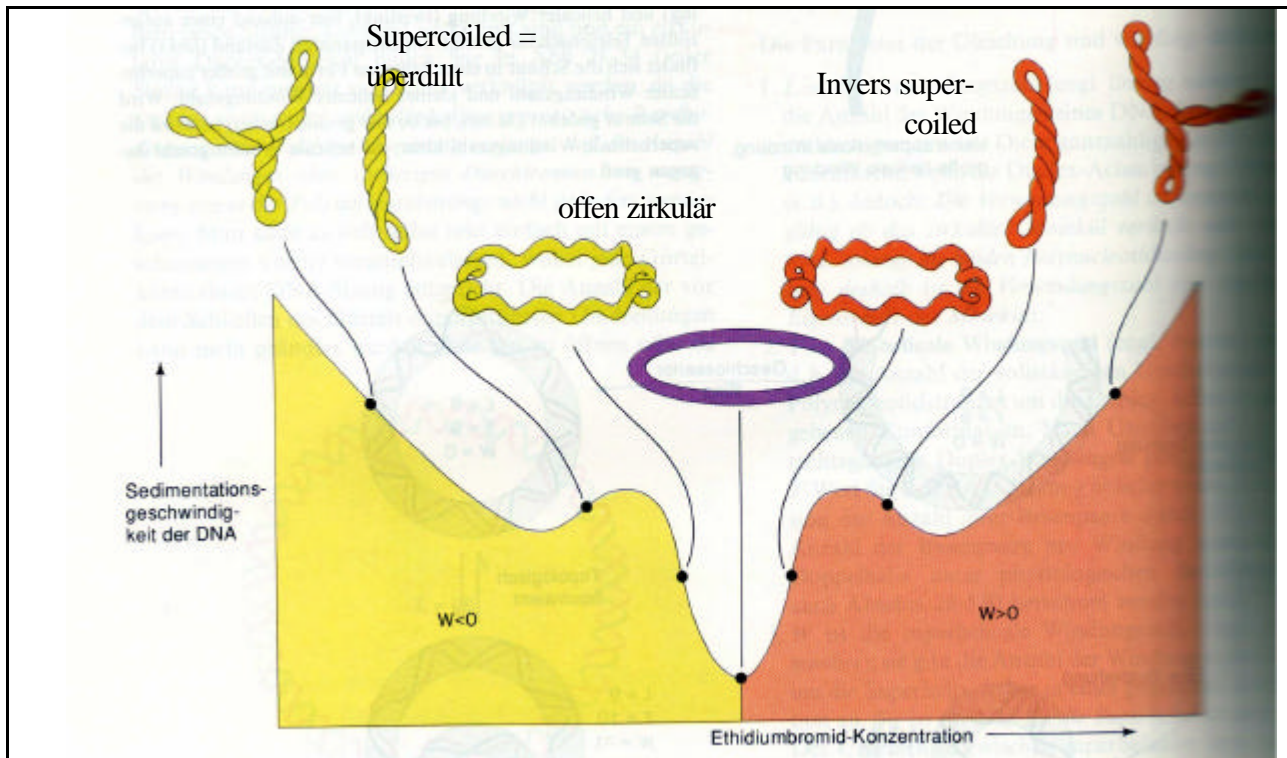


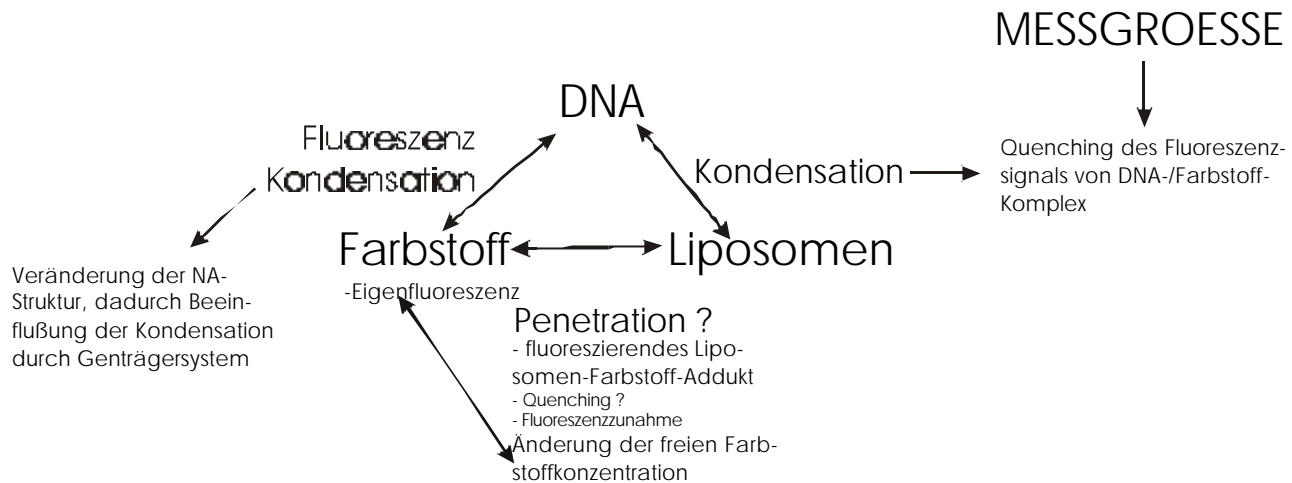
Abbildung 12-1: Dekondensation von Plasmid-DNA durch Ethidiumbromid. Mit zunehmender EB-Konzentration wird überdrillte DNA in die offene zirkuläre Form überführt, wird die Konzentration des Farbstoffs weiter erhöht, so geht die DNA in einen inversen überdrillten Zustand über (modifiziert aus [33]).

ii. Untersuchungen zu dem Einfluß des Fluoreszenzfarbstoffes haben gezeigt, dass **PicoGreen™** für die fluorimetrische Kondensationsmessungen zahlreiche Vorteile hat.

1. Keine Hintergrundfluoreszenz des freien Farbstoffs,
2. Unabhängigkeit der DNA-Kondensation von der Konzentration des Farbstoffs,
3. eine geringe Streuung des Signals von mehreren DNA-Farbstoff-Komplexen sowie
4. kein sichtbares Ausbleichen des DNA-Farbstoffkomplexes bei Messungen über mehrere Stunden,

sind Vorteile, die PicoGreen™ für die Nukleinsäurekondensation als am besten geeignet erscheinen lassen.

Ethidiumbromid



PicoGreen

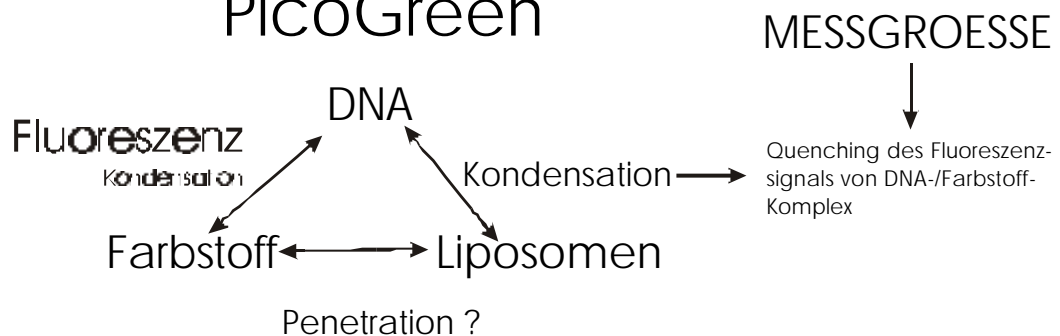


Abbildung 12-2: Quantitative fluorimetrische Messung der Kondensation von Nukleinsäuren. Durch Eigenfluoreszenz des Farbstoffs, Penetration des Farbstoffs in die Liposomen und Kondensation der DNA durch die kationischen Fluoreszenzfarbstoffe wird ein kompliziertes System mit zahlreichen Faktoren, die miteinander in Wechselwirkung treten, erhalten (Beispiel: Ethidiumbromid). Durch die Wahl des nichtfluoreszierenden PicoGreen™ als Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung der DNA wird ein mathematisch exakt beschreibbares System erhalten. Durch die hohe Spezifität für DNA und die nichtvorhandene Eigenfluoreszenz ist ein Einfluß der Penetration in liposomale Strukturen nicht zu erwarten.

Weitere Untersuchungen müssen noch zeigen, ob Nukleinsäuren durch PicoGreen™ kondensiert werden können. Dieses kann durch CsCl-Dichtezentrifugation oder Wanderung von DNA/PicoGreen™-Komplexen mit variablem PicoGreen™-Anteil im elektrischen Feld untersucht werden. Durch Verminderung der Farbstoffkonzentration kann die native Struktur der DNA erhalten bleiben.

Analoge Untersuchungen können für Oligonukleotide, die mit OliGreen™ markiert sind, durchgeführt werden.

- b. Der *Assay zur inkrementellen Kondensationsmessung* ermöglicht innerhalb kürzester Zeit eine Charakterisierung von bis zu 72 Kondensationsexperimenten mit bis zu 15 inkrementellen Zugaben von kondensierenden Verbindungen zu Nukleinsäuren. Der Assay kann sowohl zur Qualitätskontrolle von verschiedenen Nukleinsäurechargen oder Kondensationsreagentien verwendet werden als auch zur Optimierung von Genträgersystemen. Weitere Experimente müssen eine mögliche Korrelation zwischen Kondensierbarkeit von Nukleinsäuren und dem Transfektionserfolg zeigen. Das Upscaling unter Einsatz von DNA-Mengen, die für die Zellkultur realistisch sind (5 - 10 µg Nukleinsäure) muß ebenfalls noch erfolgen. Dieses konnte mangels ausreichender Mengen der Nukleinsäuren nicht durchgeführt werden.
- c. Eine mathematische Beschreibung der Titrationskurven (Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität vom Ladungsverhältnis kationische kondensierende Verbindung zu negativen Ladungen der Nukleinsäure) ist mit der Hill-Funktion möglich. Die Hill-Funktion, die zur Charakterisierung der Kooperativität der Bindung von Liganden an Rezeptoren in pharmakologischen Modellen verwendet wird, kann zur Charakterisierung der Bindung kationischer Verbindungen an Nukleinsäuren herangezogen werden. Der Hill-Koeffizient beschreibt die Änderung der DNA-Struktur, die zu einer erhöhten Affinität der kationischen Verbindung zur Nukleinsäure bzw. abnehmenden Affinität des Fluoreszenzfarbstoffs zur Nukleinsäure führt. Weitere physikalische Untersuchungen müssen noch die zwischen DNA-Kondensation durch Zugabe der kationischen Verbindung und dem Quenchen des Fluoreszenzsignals vorhandenen Mechanismus aufklären. Ursache für die Kooperativität kann zum einen die kooperative Bindung der kationischen Verbindung an die Nukleinsäure sein, andererseits ist auch kooperative Verdrängung des Farbstoffs aus der Nukleinsäure oder kooperatives intramolekulares Quenching möglich oder eine Kombination aus beiden Phänomenen. Die eher lineare Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Zugabe von Protaminsulfat (Hill-Koeffizient $p = -0,81$ im Vergleich zur sigmoidal verlaufenden Titrationskurve unter Kondensation mit Protaminsulfat (Hill-Koeffizient $p = -7,25$) zeigt, dass mittels fluorimetrischer Messung der Nukleinsäurekondensation Bindungscharakteristika verschiedener kationischer Verbindungen dargestellt werden können.

Zum Vergleich verschiedener Genträgersysteme kann nun nicht nur das mathematisch berechnete Ladungsverhältnis der kationischen Verbindung zur negativ gelade-

nen Nukleinsäure zur Charakterisierung des Genträgersystems herangezogen werden. Durch die Parameter der Hill-Funktion kann nun für jeden Punkt der Titrationskurve das Ausmaß der Kondensation als relative Fluoreszenzintensität berechnet werden. Somit steht jetzt auch eine quantitative biophysikalische Messgröße für jedes beliebige mathematische Ladungsverhältnis zur Verfügung. Die Titrationskurven zeigen, dass verschiedene Genträgersysteme und verschiedene Nukleinsäuren bei unterschiedlichen Ladungsverhältnissen die Nukleinsäuren unterschiedlich stark kondensieren. Eine Quantifizierung der Nukleinsäurekondensation und ein Vergleich von verschiedenen Genträgersystemen ist über die Kenngröße „relative Fluoreszenzintensität“ möglich.

8. Fluorimetrische Kondensationsmessungen zeigen, dass in hypotonen Lösungen Nukleinsäuren stärker kondensiert werden als in isotonischen Lösungen. Der Einfluß der Ionenstärke auf die DNA-Kondensation muß mit weiteren Assays (PCS-Komplexgrößenbestimmung, Transfektionsversuche mit Zellen) systematisch nach Art und Menge der puffernden und isotonisierenden Ionen untersucht werden.
9. Für die Messung der Assoziierung der **RNA:DNA-Hybridoligonukleotide** mit kationischen Transfektionsreagentien konnte ein fluorimetrischer Assay etabliert werden. Ein Transport von fluoreszenzmarkierten DNA-Analogen Hybridoligonukleotiden in den Zellkern konnte für komplexierte Nukleinsäuren gezeigt werden, deren Komplexierung / Kondensation mit dem Fluoreszenzassay nachweisbar war. Die Kondensation ist ein Parameter, der den Erfolg des nukleären Kerntransportes bestimmt. Eine Analytik weiterer Faktoren, die den Transfektionserfolg beeinflussen, insbesondere die Komplexgröße, konnten nicht durchgeführt werden, weil die Nukleinsäuren nicht in ausreichenden Mengen für eine systematische Untersuchung zur Verfügung standen. Die Kombination aus Komplexgrößenbestimmung mit fluoreszenzspektroskopischer Kondensationsmessung ist bei zukünftigen Experimente notwendig, weil neben dem Ausmaß der Kondensation auch die kolloidale Größe des Genträgersystems für die Transfektionseffizienz entscheidend ist. Ein Upscaling auf Zellkulturbedingungen ist für eine weitere Korrelation der fluoreszenzspektroskopischen Daten mit der Zelltransfektion unbedingt erforderlich, war aber aufgrund des zur Verfügung stehenden Materials nicht möglich. Weiterhin muß in folgenden Versuche die Transfektionseffizienz quantifiziert werden. Die bisherigen Untersuchungen hatten zum Ziel, die intrazelluläre Verteilung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden unter Einfluß verschiedener Ladungsverhältnisse von Protaminsulfat zum Oligonukleotide und den Einfluß der Inkubationszeit für einen erfolgreichen nukleären Transport zu charakterisieren. In folgenden Experimenten muß die Transfektionseffizienz (= Anzahl der fluoreszierenden Nuclei durch Gesamtzahl der Nuclei) quantifiziert werden. Eine effiziente Markierung des

Zellkerns, z. B. durch den mit UV-Licht anregbaren Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 ist notwendig.

Weiterhin muss durch Variation des nukleinsäuremarkierenden Fluoreszenzfarbstoffs und des liposomenmarkierenden Fluoreszenzfarbstoffs ein möglicher Einfluss auf das intrazelluläre Processing durch die Fluoreszenzfarbstoffe untersucht werden.

Verzeichnisse

13 Literaturverzeichnis

1. Wollenberg, B., et al., Gene therapy--phase I trial for primary untreated head and neck squamous cell cancer (HNSCC) UICC stage II-IV with a single intratumoral injection of hIL-2 plasmids formulated in DOTMA/Chol. Hum Gene Ther, 1999. **10**(1): p. 141-7.
2. Schmidt-Wolf, I.G., et al., Interleukin-7 gene transfer in patients with metastatic colon carcinoma, renal cell carcinoma, melanoma, or with lymphoma. Hum Gene Ther, 1994. **5**(9): p. 1161-8.
3. Honnefelder, L., Zur ethischen Beurteilung der somatischen Gentherapie. Internist, 1996. **37**(7): p. 382-386.
4. Krawetz, S.A., J.A. Kramer, and J.R. McCarrey, Reprogramming the male gamete genome: a window to successful gene therapy. Gene, 1999. **234**(1): p. 1-9.
5. Bagnis, C. and P. Mannoni, Stem Cell-Based Gene Therapy. Oncologist, 1997. **2**(3): p. 196-202.
6. Licht, T., et al., Efficient expression of functional human MDR1 gene in murine bone marrow after retroviral transduction of purified hematopoietic stem cells. Blood, 1995. **86**(1): p. 111-21.
7. Walsh, C.E., Fetal gene therapy. Hum Gene Ther, 1999(6): p. 1200-1201.
8. Schreier, H. and S.M. Sawyer, Liposomal Dna Vectors For Cystic Fibrosis Gene Therapy: Current Applications, Limitations, and Future Directions. Advanced Drug Delivery Reviews, 1996. **19**(1): p. 73-87.
9. Dean, M. and G. Santis, Heterogeneity in the severity of cystic fibrosis and the role of CFTR gene mutations. Hum Genet, 1994. **93**(4): p. 364-8.
10. Collins, F.S., Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. Science, 1992. **256**(5058): p. 774-9.
11. Griesenbach, U., et al., Comparison between intratracheal and intravenous administration of liposome-DNA complexes for cystic fibrosis lung gene therapy. Gene Ther, 1998. **5**(2): p. 181-8.

12. Stern, M., et al., The effect of mucolytic agents on gene transfer across a CF sputum barrier in vitro. *Gene Ther*, 1998. **5**(1): p. 91-8.
13. Schwarz, L.A., et al., Delivery of Dna Cationic Liposome Complexes By Small Particle Aerosol. *Human Gene Therapy*, 1996. **7**(6): p. 731-741.
14. Meyer, K.B., et al., Intratracheal gene delivery to the mouse airway: characterization of plasmid DNA expression and pharmacokinetics. *Gene Ther*, 1995. **2**(7): p. 450-460.
15. Fortunati, E., et al., In vitro and in vivo gene transfer to pulmonary cells mediated by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1306**(1): p. 55-62.
16. Yoshimura, K., et al., Expression of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the mouse lung after in vivo intratracheal plasmid-mediated gene transfer. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(12): p. 3233-3240.
17. Tsan, M.F., J.E. White, and B. Shepard, Lung-specific direct in vivo gene transfer with recombinant plasmid DNA. *Am J Physiol*, 1995. **268**(6 Pt 1): p. L1052-6.
18. Stribling, R., et al., Aerosol gene delivery in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(23): p. 11277-11281.
19. McLachlan, G., et al., Evaluation in Vitro and in Vivo of Cationic Liposome Expression Construct Complexes For Cystic Fibrosis Gene Therapy. *Gene Therapy*, 1995. **2**(9): p. 614-622.
20. Porteous, D.J., The mouse that might cure cystic fibrosis. *MRC News*, 1993(Spring 1993): p. 24-27.
21. Caplen, N.J., et al., Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis [see comments] [published erratum appears in *Nat Med* 1995 Mar;1(3):272]. *Nat Med*, 1995. **1**(1): p. 39-46.
22. Bordignon, C., et al., Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. *Science*, 1995. **270**(5235): p. 470-5.
23. Blaese, R.M., et al., T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, 1995. **270**(5235): p. 475-80.
24. Grossman, M., et al., Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nature Genet.*, 1994. **6**: p. 335-341.
25. Grossman, M., et al., A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nature Med.*, 1995. **1**: p. 1148-1154.
26. Lasic, D.D., *Liposomes in Gene Delivery*. 1997, Boca Raton, Florida: CRC Press.
27. Caruso, M., et al., Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(15): p. 7024-8.

28. New, R.R.C., et al., Liposomes in Biological Systems, in Liposomes - a practical approach, R.R.C. New, Editor. 1989, IRL Press: London.
29. Wu, G.Y. and C.H. Wu, Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *J Biol Chem*, 1988. **263**: p. 14621-14624.
30. Thews, G., E. Mutschler, and P. Vaupel, Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 5 ed. 1999, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
31. Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch. 1998.
32. Matern, S., Hepatologie, in Thiemes Innere Medizin, S. Matern, Editor. 1999, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 2306.
33. Voet, D. and J.G. Voet, Biochemie. 1. korrigierter Nachdruck ed. 1994, Weinheim: VCH. 1237.
34. Reinhard, E., Cytologie Genetik Physiologie Viren Bakterien Pilze Algen. Pharmazeutische Biologie. Vol. 1. 1990. 505.
35. Yáñez, R.J. and A.C. Porter, Therapeutic gene targeting. *Gene Ther*, 1998. **5**(2): p. 149-159.
36. Zelphati, O. and F.C. Szoka, Jr., Liposomes as a carrier for intracellular delivery of antisense oligonucleotides: a real or magic bullet? *J Contr Rel*, 1996. **41**: p. 99-119.
37. Verma, S. and F. Eckstein, Modified Oligonucleotides: Synthesis and Strategies for Users. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 99-134.
38. Kiehntopf, M., et al., Clinical applications of ribozymes. *Lancet*, 1995. **345**(8956): p. 1027-31.
39. Porter, A., Designer Genoms. *Technique*, 1989. **1**: p. 53-65.
40. Kmiec, E.B., A. Cole, and W.K. Holloman, The REC2 gene encodes the homologous pairing protein of *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(11): p. 7163-7172.
41. Kotani, H. and E.B. Kmiec, A role for RNA synthesis in homologous pairing events. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(9): p. 6097-6106.
42. Kotani, H., et al., RNA facilitates RecA-mediated DNA pairing and strand transfer between molecules bearing limited regions of homology. *Mol Gen Genet*, 1996. **250**(5): p. 626-634.
43. Monia, B.P., et al., Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2' -deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J Biol Chem*, 1993. **268**(19): p. 14514-14522.
44. Yoon, K., A. Cole Strauss, and E.B. Kmiec, Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA.DNA oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(5): p. 2071-2076.

45. Kren, B.T., et al., Targeted nucleotide exchange in the alkaline phosphatase gene of HuH-7 cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Hepatology*, 1997. **25**(6): p. 1462-1468.
46. Kolodner, R.D., Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends Biochem Sci*, 1995. **20**(10): p. 397-401.
47. Cole Strauss, A., et al., Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide [see comments]. *Science*, 1996. **273**(5280): p. 1386-1389.
48. Bandyopadhyay, P., et al., Nucleotide exchange in genomic DNA of rat hepatocytes using RNA/DNA oligonucleotides. Targeted delivery of liposomes and polyethyleneimine to the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem*, 1999. **274**(15): p. 10163-72.
49. Thomas, K.R. and M.R. Capecchi, Recombinant DNA technique and sickle cell anemia research [letter; comment]. *Science*, 1997. **275**(5305): p. 1404-1405.
50. Stasiak, A., S.C. West, and E.H. Egelman, Sickle cell anemia research and a recombinant DNA technique [letter; comment]. *Science*, 1997. **277**(5325): p. 460-462.
51. Strauss, M., The site-specific correction of genetic defects. *Nat Med*, 1998. **4**(3): p. 274-275.
52. Alexeev, V. and K. Yoon, Stable and inheritable changes in genotype and phenotype of albino melanocytes induced by an RNA-DNA oligonucleotide [see comments]. *Nat Biotechnol*, 1998. **16**(13): p. 1343-1346.
53. Beetham, P.R., et al., A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(15): p. 8774-8.
54. Behr, J.P., Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconjug. Chem.*, 1994. **5**(5): p. 382-389.
55. Chalfie, M., et al., Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994. **263**(5148): p. 802-5.
56. Zolotukhin, S., et al., A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J Virol*, 1996. **70**(7): p. 4646-54.
57. Cormack, B.P., R.H. Valdivia, and S. Falkow, FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 1996. **173**(1): p. 33-8.
58. Stripecke, R., et al., Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy. *Gene Ther*, 1999. **6**(7): p. 1305-1312.
59. Lottspeich, F. and H. Zorbas, *Bioanalytik*. 1998, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

60. Zelphati, O., et al., Gene chemistry: functionally and conformationally intact fluorescent plasmid DNA. *Hum Gene Ther*, 1999. **10**(1): p. 15-24.
61. Zanta, M.A., P. Belguise Valladier, and J.P. Behr, Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(1): p. 91-96.
62. Felgner, P.L., et al., Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(21): p. 7413-7417.
63. Boussif, O., et al., A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(16): p. 7297-7301.
64. Widom, J. and R.L. Baldwin, Cation-induced toroidal condensation of DNA studies with $\text{Co}^{3+}(\text{NH}_3)_6$. *J Mol Biol*, 1980. **144**(4): p. 431-53.
65. Zhu, T., et al., Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(15): p. 8768-73.
66. Wolff, J.A., et al., Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 1990. **247**(4949 Pt 1): p. 1465-1468.
67. Yankauckas, M.A., et al., Long-term anti-nucleoprotein cellular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing NP gene. *DNA Cell Biol*, 1993. **12**(9): p. 771-6.
68. Ardehali, A., et al., Direct gene transfer into donor hearts at the time of harvest. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1995. **109**(4): p. 716-9; discussion 719-20.
69. Miller, A.D., Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther*, 1990. **1**(1): p. 5-14.
70. Temin, H.M., Safety considerations in somatic gene therapy of human disease with retrovirus vectors. *Hum Gene Ther*, 1990. **1**(2): p. 111-23.
71. Cornetta, K., et al., Amphotropic murine leukemia retrovirus is not an acute pathogen for primates. *Hum Gene Ther*, 1990. **1**(1): p. 15-30.
72. Cornetta, K., R.A. Morgan, and W.F. Anderson, Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer in humans. *Hum Gene Ther*, 1991. **2**(1): p. 5-14.
73. Vile, R.G. and I.R. Hart, In vitro and in vivo targeting of gene expression to melanoma cells. *Cancer Res*, 1993. **53**(5): p. 962-7.
74. Donahue, R.E., et al., Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med*, 1992. **176**(4): p. 1125-35.
75. Kotin, R.M., Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Hum Gene Ther*, 1994. **5**(7): p. 793-801.

76. Ledley, F.D., Pharmaceutical Approach to Somatic Gene Therapy. *Pharm. Res.*, 1996. **13**(11): p. 1595-1613.
77. Amos, H., Protamine enhancement of RNA uptake by cultured chicken cells. *Biochem Biophys Res Comm*, 1961. **5**: p. 1-4.
78. Felgner, J.H., et al., Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem*, 1994. **269**(4): p. 2550-2561.
79. Leventis, R. and J.R. Silvius, Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim Biophys Acta*, 1990. **1023**(1): p. 124-132.
80. Nabel, E.G., G. Plautz, and G.J. Nabel, Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall. *Science*, 1990. **249**(4974): p. 1285-8.
81. Gao, X. and L. Huang, A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. **179**(1): p. 280-285.
82. Behr, J.P., et al., Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Cell Biology*, 1989. **86**: p. 6982-6986.
83. Gao, X. and L. Huang, Cationic Liposome Mediated Gene Transfer. *Gene Therapy*, 1995. **2**(10): p. 710-722.
84. Zhou, X. and L. Huang, DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1189**(2): p. 195-203.
85. Niven, R., et al., Biodistribution of radiolabeled lipid-DNA complexes and DNA in mice. *J Pharm Sci*, 1998. **87**(11): p. 1292-9.
86. Barron, L.G., L. Gagne, and F.C. Szoka, Jr., Lipoplex-mediated gene delivery to the lung occurs within 60 minutes of intravenous administration. *Hum Gene Ther*, 1999. **10**(10): p. 1683-94.
87. Lasic, D.D., Structure and Structure-Activity Relationships of Lipid-Based Gene Delivery Systems, in *Nonviral Vectors for Gene Therapy*, L. Huang, M.-C. Hung, and E. Wagner, Editors. 1999, Academic Press: New York. p. 69-91.
88. Nabel, G.J., et al., Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(23): p. 11307-11311.
89. Rubin, J., et al., Phase I study of immunotherapy of hepatic metastases of colorectal carcinoma by direct gene transfer of an allogeneic histocompatibility antigen, HLA-B7. *Gene Ther*, 1997. **4**(5): p. 419-25.

90. McLachlan, G., et al., Laboratory and clinical studies in support of cystic fibrosis gene therapy using pCMV-CFTR-DOTAP. *Gene Ther*, 1996. **3**(12): p. 1113-23.
91. Ando, T., M. Yamasaki, and K. Suzuki, Protamines. Isolation, characterization, structure and function. *Mol Biol Biochem Biophys*, 1973. **12**: p. 1-114.
92. Felix, K., Protamines and nucleoprotamines, in *The chemical structure of proteins*, G.E.W. Wolstenholme and M.P. Cameron, Editors. 1953: London. p. 151-164.
93. Amos, H.K., K.E., Influence of bacterial ribonucleic acid on animal cell culture. II. Protamine enhancement of RNA uptake. *Exp Cell Res*, 1963. **32**: p. 14-25.
94. Mendicki, J. and T. Wilczok, The interaction of basic proteins during the donor DNA incorporation into neoplastic cells. *Neoplasma (Bratisl.)*, 1963. **10**: p. 561-564.
95. Wilczok, T. and J. Mendicki, The effect of protamines and histones on incorporation of donor DNA into neoplastic cells. *Neoplasma (Bratisl.)*, 1963. **10**: p. 113-119.
96. Sorgi, F.L., S. Bhattacharya, and L. Huang, Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. *Gene Therapy*, 1997. **4**: p. 961-968.
97. Gagné, L., et al., Gene delivery to hepatocytes using serum-stable, targeted anionic liposomes. *J Liposome Res*, 1998. **8**(1): p. 57-58.
98. Godbey, W., et al., Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency. *Gene Ther*, 1999. **6**(8): p. 1380-1388.
99. Zanta, M.A., et al., In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated poly-ethylenimine. *Bioconjug Chem*, 1997. **8**(6): p. 839-44.
100. Choi, Y.H., et al., Characterization of a targeted gene carrier, lactose-polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine and its complex with plasmid DNA. *Hum Gene Ther*, 1999. **10**(16): p. 2657-65.
101. Choi, Y.H., et al., Lactose-poly(ethylene glycol)-grafted poly-L-lysine as hepatoma cell- targeted gene carrier. *Bioconjug Chem*, 1998. **9**(6): p. 708-18.
102. Chander, R. and H. Schreier, Artificial viral envelopes containing recombinant human immunodeficiency virus (HIV) gp160. *Life Sci*, 1992. **50**(7): p. 481-489.
103. Li, S. and L. Huang, Novel Lipidic Vectors for Gene Transfer, in *Nonviral Vectors for Gene Therapy*, L. Huang, M.-C. Hung, and E. Wagner, Editors. 1999, Academic Press: New York. p. 290-313.
104. Gao, X. and L. Huang, Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry*, 1996. **35**(3): p. 1027-1036.
105. Lee, R.J. and L. Huang, Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J Biol Chem*, 1996. **271**(14): p. 8481-7.

106. Bandyopadhyay, P., et al., Enhanced gene transfer into HuH-7 cells and primary rat hepatocytes using targeted liposomes and polyethylenimine. *Biotechniques*, 1998. **25**(2): p. 282-4, 286-92.
107. Yonemitsu, Y., et al., HVJ (Sendai virus)-cationic liposomes: a novel and potentially effective liposome-mediated technique for gene transfer to the airway epithelium. *Gene Ther*, 1997. **4**(7): p. 631-8.
108. Philip, R., et al., Efficient and sustained gene expression in primary T lymphocytes and primary and cultured tumor cells mediated by adeno-associated virus plasmid DNA complexed to cationic liposomes. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(4): p. 2411-2418.
109. Meunier-Durmort, C., et al., Mechanism of adenovirus improvement of cationic liposome-mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1330**(1): p. 8-16.
110. Zabner, J., et al., Cellular and Molecular Barriers to Gene Transfer By a Cationic Lipid. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(32): p. 18997-19007.
111. Friend, D.S., D. Papahadjopoulos, and R.J. Debs, Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1278**(1): p. 41-50.
112. Mislick, K.A. and J.D. Baldeschwieler, Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(22): p. 12349-54.
113. Labat-Moleur, F., et al., An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther*, 1996. **3**(11): p. 1010-1017.
114. Zelphati, O. and F.C.J. Szoka, Cationic liposomes as an oligonucleotide carrier: mechanism of action. *J Liposome Res*, 1997. **7**(1): p. 31-49.
115. Hui, S.W., et al., The Role of Helper Lipids in Cationic Liposome Mediated Gene Transfer. *Biophysical Journal*, 1996. **71**(2): p. 590-599.
116. Bloomfield, V.A., Dna Condensation. *Current Opinion in Structural Biology*, 1996. **6**(3): p. 334-341.
117. Xu, Y. and F.C. Szoka, Jr., Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry*, 1996. **35**(18): p. 5616-5623.
118. Gershon, H., et al., Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry*, 1993. **32**(28): p. 7143-7151.
119. Sternberg, B., F.L. Sorgi, and L. Huang, New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. *FEBS Lett*, 1994. **356**(2-3): p. 361-366.

120. Birchall, J.C., I.W. Kellaway, and S.N. Mills, Physico-chemical characterisation and transfection efficiency of lipid- based gene delivery complexes. *Int J Pharm*, 1999. **183**(2): p. 195-207.
121. Sternberg, B., Morphology of cationic liposome/DNA complexes in relation to their chemical composition. *J Liposome Res*, 1996. **3**(6): p. 515-533.
122. Gustafsson, J., et al., Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **123**(52): p. 305-312.
123. Rädler, J.O., et al., Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes [see comments]. *Science*, 1997. **275**(5301): p. 810-814.
124. Valnes, K. and P. Brandtzaeg, Retardation of immunofluorescence fading during microscopy. *J Histochem Cytochem*, 1985. **33**(8): p. 755-761.
125. Chung, C.T., S.L. Niemela, and R.H. Miller, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 1989. **86**: p. 2172-2175.
126. Groth, D., R. Reszka, and J.A. Schenk, Polyethylene Glycol-Mediated Transformation of *Escherichia coli* Is Increased by Room Temperature Incubation. *Anal Biochem*, 1996. **240**: p. 302-304.
127. Genomed, JetStar 2.0 Plasmid Isolation Kit. 1996.
128. QIAGEN, QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Protocol. 1996.
129. Gallagher, S.R., Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy, in *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel, et al., Editors. 1989, John Wiley & Sons: New York. p. A.3D.1-A.3D.8.
130. Warburg, O. and W. Christian, Isolation and crystallization of enolase. *Biochem Z*, 1942. **310**: p. 384-421.
131. Wilfinger, W.W., K. Mackey, and P. Chomczynski, Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 1997. **22**(3): p. 474-6, 478-81.
132. Aberle, A.M., et al., The counterion influence on cationic lipid-mediated transfection of plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1299**(3): p. 281-283.
133. Le Pecq, J.B. and C. Paoletti, A New Fluorometric Method for RNA and DNA Determination. *Anal. Biochem.*, 1966. **17**: p. 100-107.
134. Szoka, F.C., Jr., Y. Xu, and O. Zelphati, How are Nucleic Acids released in Cells from Cationic Lipid-Nucleic Acid Complexes? *J Liposome Res*, 1996. **3**(6): p. 567-587.

135. Bauer, W.R., F.H. Crick, and J.H. White, Supercoiled DNA. *Sci Am*, 1980. **243**(1): p. 100-113.
136. Haugland, R.P., *Molecular Probes' Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Sixth Edition. 1996: p. 144-156.
137. Haugland, R.P., *Molecular Probes' Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Sixth Edition. : p. 161-174.
138. Shakesheff, K.M., et al., The role of scanning probe microscopy in drug delivery research. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996. **13**(3-4): p. 225-56.
139. Binning, G., et al., Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 1982. **49**(1): p. 57-61.
140. Binning, G., C.F. Quate, and C. Gerber, Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 1986. **56**: p. 930-933.
141. Hansma, P.K., et al., Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Appl Phys Lett*, 1994. **64**(13): p. 1738-1740.
142. Babcock, K.L. and C.B. Prater, Digital Instruments, Santa Barbara, CA, 1995.
143. Argaman, M., et al., Phase imaging of moving DNA molecules and DNA molecules replicated in the atomic force microscope. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(21): p. 4379-4384.
144. Heckl, W.M. and G. Binnig, Domain walls on graphite mimic DNA. *Ultramicroscopy*, 1992. **42-44**(Pt B): p. 1073-8.
145. Bustamante, C., et al., Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy. *Biochemistry*, 1992. **31**(1): p. 22-26.
146. Hansma, H.G., et al., Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the atomic force microscope. *Science*, 1992. **256**(5060): p. 1180-1184.
147. Thundat, T., et al., Atomic force microscopy of DNA on mica and chemically modified mica. *Scanning Microsc*, 1992. **6**(4): p. 911-8.
148. Allen, M.J., et al., Tip-radius-induced artifacts in AFM images of protamine-complexed DNA fibers. *Ultramicroscopy*, 1992. **42-44**(Pt B): p. 1095-1100.
149. Israelachvili, J., *Intermolecular and Surface Forces*. 1992, New York: Academic Press.
150. Lyubchenko, Y.L., B.L. Jacobs, and S.M. Lindsay, Atomic force microscopy of reovirus dsRNA: a routine technique for length measurements. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(15): p. 3983-3986.
151. Yang, J., K. Takeyasu, and Z. Shao, Atomic force microscopy of DNA molecules. *FEBS Lett*, 1992. **301**(2): p. 173-176.

152. Hansma, H.G. and D.E. Laney, DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy. *Biophys J*, 1996. **70**(4): p. 1933-9.
153. Mou, J., et al., High-resolution atomic-force microscopy of DNA: the pitch of the double helix. *FEBS Lett*, 1995. **371**(3): p. 279-282.
154. Zhang, Y., S. Sheng, and Z. Shao, Imaging biological structures with the cryo atomic force microscope. *Biophys J*, 1996. **71**(4): p. 2168-2176.
155. Lantz, M.A., S.J. O'-Shea, and M.E. Wellan, Force microscopy imaging in liquids using ac techniques. *Appl Phys Lett*, 1994. **65**(4): p. 409-411.
156. Han, W., S.M. Lindsay, and T. Jing, A magnetically-driven oscillating probe microscope for operation in liquids. *Appl. Phys. Lett.*, 1996.
157. Han, W., et al., Cryo atomic force microscopy: a new approach for biological imaging at high resolution. *Biochemistry*, 1995. **34**(26): p. 8215-8220.
158. Kawaura, C., et al., Atomic force microscopy for studying gene transfection mediated by cationic liposomes with a cationic cholesterol derivative. *FEBS Lett*, 1998. **421**(1): p. 69-72.
159. Hart, S.L., et al., Lipid-mediated enhancement of transfection by a nonviral integrin-targeting vector. *Hum Gene Ther*, 1998. **9**(4): p. 575-585.
160. Zareye, M.H., et al., Scanning tunneling microscopy investigation of liposome-DNA- Ca^{2+} complexes. *J Liposome Res*, 1997. **7**(4): p. 491-502.
161. Allen, M.J., E.M. Bradbury, and R. Balhorn, AFM analysis of DNA-protamine complexes bound to mica. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(11): p. 2221-2226.
162. Nordström, K., Plasmid replication and maintenance, in *Plasmids*, K.G. Hardy, Editor. 1993, Oxford University Press Inc.: New York. p. 1-38.
163. Stryer, L., *Biochemistry*. 1995. 1065.
164. Bennett, M.J., et al., Cholesterol enhances cationic liposome-mediated DNA transfection of human respiratory epithelial cells. *Biosci Rep*, 1995. **15**(1): p. 47-53.
165. Templeton, N.S., et al., Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nat Biotechnol*, 1997. **15**(7): p. 647-652.
166. Zelphati, O. and F.C. Szoka Jr, Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm Res*, 1996. **13**(9): p. 1367-1372.
167. Bennett, R.M., As nature intended? The uptake of DNA and oligonucleotides by eukaryotic cells. *Antisense Res Dev*, 1993. **3**(3): p. 235-241.
168. Aloia, R.C., et al., Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(3): p. 900-4.

169. Schreier, H., et al., (Patho)physiologic pathways to drug targeting: artificial viral envelopes. *J Mol Recognit*, 1995. **8**(1-2): p. 59-62.
170. Loke, S.L., et al., Delivery of c-myc antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides to hematopoietic cells in culture by liposome fusion: specific reduction in c-myc protein expression correlates with inhibition of cell growth and DNA synthesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1988. **141**: p. 282-289.
171. Thierry, A.R., A. Rahman, and A. Dritschilo, Overcoming multidrug resistance in human tumor cells using free and liposomally encapsulated antisense oligodeoxynucleotides. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **190**(3): p. 952-960.
172. Santella, R.M. and H.J. Li, Studies on interaction between poly(L-lysine58, L-phenylalanine42) and deoxyribonucleic acids. *Biochemistry*, 1975. **14**(16): p. 3604-11.
173. Baeza, I., et al., Electron microscopy and biochemical properties of polyamine-compacted DNA. *Biochemistry*, 1987. **26**(20): p. 6387-92.
174. Thierry, A.R. and A. Dritschilo, Intracellular availability of unmodified, phosphorothioated and liposomally encapsulated oligodeoxynucleotides for antisense activity. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(21): p. 5691-8.
175. Yakubov, L.A., et al., Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(17): p. 6454-6458.
176. Wu Pong, S., T.L. Weiss, and C.A. Hunt, Antisense c-myc oligodeoxyribonucleotide cellular uptake. *Pharm Res*, 1992. **9**(8): p. 1010-1017.
177. Stein, C.A., et al., Dynamics of the internalization of phosphodiester oligodeoxynucleotides in HL60 cells. *Biochemistry*, 1993. **32**(18): p. 4855-4861.
178. Schreier, H., P. Moran, and I.W. Caras, Targeting of liposomes to cells expressing CD4 using glycosylphosphatidylinositol- anchored gp120. Influence of liposome composition on intracellular trafficking. *J Biol Chem*, 1994. **269**(12): p. 9090-9098.
179. Godbey, W.T., K.K. Wu, and A.G. Mikos, Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(9): p. 5177-81.
180. QIAGEN, QIAGEN Genomic DNA Handbook. 1997.
181. Blaese, R.M. A strategy for therapy using gene repair with dimeric RNA-DNA oligonucleotides. in *Seventh Meeting of the European Society of Gene Therapy*. 1999. Munich.

14 Abkürzungsverzeichnis

AAV: adenoassoziierte Viren	EiPC: Phosphatidylcholin, gewonnen aus Eigelb
ADA: Adenosindesaminase	EM: Elektronenmikroskopie
AHAS: Acetohydroxysäuresynthetase	EthH-2: Ethidiumhomodimer-2
ALS: Acetolactatsynthetase	GFP: green fluorescent protein
AO: Acridinorange	GTE-Puffer: Glucose 50 mM, Tris 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0
AVE: artificial viral envelops	HBV: Hepatitis B Virus
CAT: Chloramphenicolacetattransferase	HIV: human immunodeficiency virus
CF: zystische Fibrose (cystic fibrosis)	HSV: Herpes simplex Virus
Ch: Charge	HVJ: hämagglutinierendes Virus aus Japan
CHEMS: Cholesterylhemisuccinat	i. d. R.: in der Regel
CLSM: confocal laser scanning microscopy	IL: Interleukin
CMV: cytomegalie virus	k. A.: keine Angabe
DABCO: Diazabicyclooctan	kb: kilo bases (1 kb = 1000 Basenpaare)
DLS: dynamic light scattering	LDL: low density lipoproteins
DMRIE: dimyristoyloxypropyldimethylhydroxyethylammonium bromide	Lipofectamin [®] : DOSPA / DOPE (3:1)
DMSO: Dimethylsulfoxid	Lipofectin [®] : DOTMA / DOPE (1:1)
DNA:DNA-oligo: doppelsträngiges DNA:DNA-Oligonukleotid (hier: 68 Basen)	LPD-I: cationic liposome entrapped, polycation-condensed DNA
DNA-oligo: einzelsträngiges DNA-Oligonukleotid (hier: 20 Basen)	LPD-II anionic liposome-entrapped, polycation condensed DNA
DOPC: Dioleoylphosphatidylcholin	LPEI: lactosyliertes Polyethylenimin
DOPE: Dioleoylphosphatidylethanolamin	LPLL: Lipopolylysin
DOTAP: Dioleoyloxytrimethylammoniumpropan	MDR: multi drug resistance
EB: Ethidiumbromid	MEM: minimal essential medium
eGFP: enhanced green fluorescent protein	MLV: multilamellar vesicles
	NA: Nukleinsäuren (von nucleic acids)
	NIH: National Institute of Health
	NLS: nuclear localisation sequence

OD: optische Dichte	SCID: several combined immunodeficiency syndrom
ON: Oligonucleotid	SFM: scanning force microscopy
ONs: Oligonucleotide (Mehrzahl)	SPM: scanning probe microscopy
PBS: phosphate buffered saline	SUV: small unilamellar vesicles
PCS: Photonenkorrelationsspektroskopie	SV: simian virus
PEI: Polyethylenimin	TAE-Puffer: Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
PLL: Poly-L-lysin	TAP: Trimethylammoniumpropan (DOTAP; DMTAP; DSTAP, etc)
PMg-Puffer: Phosphat 10 mM, Magnesiumchlorid 2,5 mM, pH 7,5	TBE-Puffer: Tris-Borat-EDTA-Puffer
PNA: peptid nucleic acids	TMAG: (N-(α -trimethylammoniumacetyl)- didocyl-D-glutamatchlorid)
P-Puffer: Phosphat 7,5 mM, pH 7,5 bzw. 20 mM pH 7,5 (s. S. 55)	TMg-Puffer: Tris 10 mM, Magnesiumchlorid pH 7,5
PS: Protaminsulfat	TN-Puffer: Tris 10 mM, Natriumchlorid 140 mM, pH 7,5
PVA: Polyvinylalkohol	TPE-Puffer: Tris-Phosphat-EDTA-Puffer
PWS: Phosphorwolframsäure	T-Puffer: Tris 10 mM, pH 7,5
RAC: Recombinant DNA Advisory Commitee	Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
RES: Retikuloendotheliales System	u.a.: und andere
RFLP: restriction fragment length polymorphism	UF: Uranylformiat
RI: relative Intensität	US: Ultraschall
RNA:DNA-Oligo: RNA:DNA- Hybridoligonukleotid = Chimeraplast	v.a.: vor allem
RT: Raumtemperatur	VT: Volumenteile
s.d.: Standardabweichung	λ_{em} : Emissionswellenlänge
SAXS: small angle X-ray scattering	λ_{ex} : Excitationswellenlänge

Lebenslauf

Name:	Christian Welz
Geburtsdatum:	03. November 1967
Geburtsort:	Menden / Sauerland
1974 – 1978	Grundschule Josefschule in Menden / Sauerland
1978 – 1987	Heilig-Geist-Gymnasium in Menden / Sauerland mit Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife
Sep 1987 – Juni 1989	Berufsfachschule für pharmazeutisch-technische Assis- tenten in Dortmund / Marten
Juli 1989 – Jan 1990	PTA-Praktikum in der Dorf-Apotheke und Post-Apotheke in Menden / Sauerland
Feb 1990	Staatliche Abschlussprüfung zum Beruf des „pharma- zeutisch-technischen Assistenten“
April 1990 – März 1991	Wehrdienst im Institut für Radiologie der Akademie für Sanitäts- und Gesundheitswesen der Bundeswehr in München / Neuherberg
April 1991 – Mai 1995	Pharmazie-Studium an der Philipps-Universität in Marburg
Juni 1995 – Nov 1995	Pharmazie-Praktikum in der Qualitätskontrolle der Firma Hoechst AG
Nov 1995 – Mai 1996	Pharmazie-Praktikum in der Schloß-Apotheke in Biedenkopf
Juni 1996	3. Staatsexamen und Approbation zum Apotheker
seit April 1996	Promotion unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Fahr am Institut für Pharmazeutische Technologie und Bio- pharmazie der Philipps-Universität, Marburg

Abstracts, Poster und Publikationen

Publikationen

- Nuclear transport of oligonucleotides in HepG2-cells mediated by protamine sulfate and negatively charged liposomes
C. Welz, W. Neuhuber, H. Schreier, R. Repp, W. Rascher, A. Fahr
submitted to "Pharm Res"

Abstracts von Vorträgen und Kongressen

1. Welz, C. and A. Fahr, Interaction between DNA, nucleic acid stains and differently charged lipids. in press, 1997.
2. Fahr, A., Butt, H-J., Nelles, G., Welz, C., Biophysical aspects of nonviral gene delivery systems. J Liposome Res, 1998. 8(1): p. 9-12.
3. Welz, C., Nelles, G., Butt, HJ., Fahr, A., Atomic force microscopy (AFM) in Tapping Mode is a powerful tool to visualise lipid-condensed plasmids. J Liposome Res, 1998. 8(1): p. 121-122.
4. Welz, C. and A. Fahr, High sensitive dye-exclusion technique for measurement of DNA-condensation with cationic liposomes and proteins. J Liposome Res, 1998. 8(1): p. 122-124.
5. Welz, C., Neuhuber, W., Schreier, H., Repp, R., Rascher, W., Fahr, A., Nuclear gene targeting using negatively charged liposomes. Int J Pharm, 2000. in press.
6. Welz, C. and A. Fahr, Condensation of nucleic acids: Fluorimetric monitoring of the condensation event. J Gene Medicine, 1999. 1(Supplement to No 6): p. 36

Poster

Kongress	Ort Datum	Titel Autoren
Colloidal Drug Carriers 3 rd Expert Meeting	Berlin 29.-31.05.97	Interaction between DNA, nucleic acid stains and differently charged lipids Welz, C.; Fahr, A.
4 th Students Seminar on Supramolecular Science (Minerva Workshop)	Kibbutz Kfar Blum, Israel 15.-18.03.98	AFM - A Powerful Tool to Understand Molecular Architecture Nelles, G.; Butt, H.J.; Küther, J.; Seshadri, R.; Tremel, W.; Welz, C.; Fahr, A.
2 nd World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, Pharmaceutical Technology	Paris 25.-28.05.98	Measurement of extent and kinetics of DNA-condensation by dye-exclusion in 96 well plates Welz, C.; Fahr, A. Investigation of plasmid-DNA/cationic lipid-complexes by tapping mode Atomic Force Microscopy (AFM) Welz, C.; Nelles, G.; Butt, H.J.; Fahr, A.
The Sixth Liposome Research Days Conference	Les Embiez, Frankreich 28.-31.05.98	Atomic force microscopy (AFM) in Tapping Mode is a powerful tool to visualise lipid-condensed plasmids Welz, C.; Nelles, G.; Butt, H.J.; Fahr, A. High sensitive dye-exclusion technique for measurement of DNA-condensation with cationic liposomes and proteins Welz, C.; Fahr, A.
Colloidal Drug Carriers 4 th Expert Meeting	Berlin 03.-05.06.99	Nuclear gene targeting using negatively charged liposomes Welz, C.; Neuhuber, W.; Schreier, H.; Repp, R.; Rascher, W.; Fahr, A.
7 th Meeting of the European Society of Gene Therapy	München 26.-28.11.99	Condensation of nucleic acids: Fluorimetric monitoring of the condensation event Welz, C. and A. Fahr